

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

DE LYON

Année 1965 - N° 22

HEPATITES EXPERIMENTALES
ET TESTS DE TRIAGE
DES MEDICAMENTS HEPATOPROTECTEURS

THÈSE

présentée

à LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le Lundi 26 Avril 1965

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Pharmacie

par

COQUET Bernard

Pharmacien - Licencié ès Sciences

22 Décembre 1938

LYON (Rhône)

F. ANDRE

5 rue Bugeaud

LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

DE LYON

Année 1965 - N° 22

HEPATITES EXPERIMENTALES

ET TESTS DE TRIAGE

DES MEDICAMENTS HEPATOPROTECTEURS

THÈSE

présentée

à LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le Lundi 26 Avril 1965

pour obtenir le grade de Docteur d'Etat en Pharmacie

par

COQUET Bernard

Pharmacien - Licencié ès Sciences

22 Décembre 1938

LYON (Rhône)



F. ANDRE

5 rue Bugeaud

LYON

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyens Honoraires : M. J. LEPINE, Membre de l'Institut
M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut

Doyen : M. J.F. CIER

Assesseurs : MM. LEVRAT - L. REVOL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. PÂTEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN
GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLO.

PROFESSEURS

MM.

CIBERT	Clinique Urologique
PONTHUS (détaché à Beyrouth)	Physique biologique
DECHAUME	Clinique Neuro-psychiatrique et d'Hygiène menta
CHAMBON	Chimie organique et toxicologie
WERTHEIMER	Clinique chirurgicale P
PAUPERT-RAVAULT	Clinique médicale B
FROMENT	Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires
CROIZAT	Clinique médicale C
ENSELME	Chimie biologique et médicale
MALLET-GUY	Clinique chirurgicale A
REVOL	Pharmacie galénique
PIGEAUD	Clinique Obstétricale
BOURRET	Médecine du travail
LEVRAT	Clinique médicale A
SOHIER	Hygiène et action sanitaire et sociale
NETIEN	Botanique et cryptogamie
BERTRAND	Clinique chirurgicale C
BADINAND	Chimie analytique pharmaceutique
DREVON	Pharmacie chimique et pharmacologie
ROCHE	Médecine légale et déontologie
COUDERT	Parasitologie et pathologie exotique
MOUNIER-KUHN	Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'audio- phonologie
PAUFIQUE	Clinique ophtalmologique
THIERS	Clinique de dermatologie, syphillographie et allergologie
BRUN	Clinique de pneumo-ptisiologie
GREYSSEL	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique

MM.

DARGENT	Clinique carcinologique
GUICHARD	Anatomie pathologique
GIRARD Paul	Pathologie générale et expérimentale
LATARJET	Anatomie
PEYCELON	Pathologie chirurgicale
GIRARD Marcel	Clinique médicale D
VACHON	Pathologie médicale
GALY	Physio-pathologie des voies respiratoires
PAPILLON	Radiologie
JEUNE	Clinique médicale Infantile et Hygiène du 1er âge
GONIN	Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale
MONNET	Bactériologie
BANSSILLON	Physiologie et pathologie obstétricales
CHATONNET	Physiologie B
GUINET	Clinique endocrinologique
TRILLAT	Clinique de chirurgie orthopédique
FREIDEL	Clinique stomatologique
MARION Joseph	Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles
DORCHE	Matière médicale et législation pharmaceutique
DUMONT Louis	Histologie et embryologie
PERROT	Chimie
CIER J.F.	Physiologie A
PERRIN J.	Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire
MICHAUD Pierre	Clinique de chirurgie cardiaque
SARROUY Charles	Clinique médicale infantile
X.....	Clinique des maladies infectieuses
X.....	Biologie médicale et pharmacodynamie
X.....	Clinique gynécologique
X.....	Thérapeutique

MM.

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

BERGER	Physique nucléaire appliquée à la médecine
BERTOYE	Bactériologie
MANSUY	Neuro-chirurgie
COLLET	Chimie générale et pharmaceutique
LACROIX	Hygiène et climatologie
LIARAS	Clinique chirurgicale propédeutique
LECUIRE	Neuro-chirurgie
REVOL	Médecine générale
GOINARD	Thérapeutique chirurgicale
CIER André	Pharmacie Chimique et Pharmacologie
PONT Maurice	Médecine générale
TRAEGER	Médecine générale

MM.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

ROMAN	Parasitologie
-------	---------------

MM.

FEROLDI	Anatomie pathologique
MORET	Physique biologique
ODDOUX	Botanique et cryptogamie
de SOLLIERS	Chimie analytique
DESPIERRES	Médecine générale
GARIN	Parasitologie
TOLOT	Médecine du travail

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES TITULAIRES

MM.

GREYSEL Roger	Chimie biologique
THIVOLET	Hygiène
PINET	Electro-Radiologie
GUYOTAT	Neuro-psychiatrie
DESCOTES	Chirurgie générale
JOUVET	Pathologie expérimentale
PEYRIN	Physique biologique
TOMMASI	Anatomie pathologique
BUFFARD	Electro-radiologie
LEJEUNE	Médecine générale et thérapeutique
de MOURGUES F.	Stomatologie
NAUSSAC	Maladies infectieuses
REBOUILLAT	Chirurgie générale
ROMAGNY	Pédiatrie
DELAHAYE	Médecine générale
DELEUZE	Anesthésiologie
GIRAUD	Electro-radiologie diagnostique et thérapeutique
MICHEL	Anesthésiologie
FRANCOIS	Pédiatrie et puériculture
MICHOULIER	Chirurgie générale
COLOMB	Dermatologie
LAMBERT	Médecine Générale
FRIES	Médecine Générale
GILLY	Pédiatrie
ROBERT	Médecine Générale
BOUCHET	Anatomie
BETHENOD	Pédiatrie
GERMAIN	Immunologie, sérologie, hématologie
KALB	Pneumo-phthisiologie
LARBRE	Pédiatrie
SOUSTELLE	Chirurgie Générale
VIALA	Médecine Générale
VINCENT	Bactériologie, parasitologie, virologie
COLIN	Médecine légale

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES STAGIAIRES

MM.

FAVRE-GILLY	Hématologie
GIROD	Histologie et embryologie

MM.

GRAS	Chimie biologique
MALLEIN	Chimie analytique
RIFFAT	Hygiène
FAUCON	Biologie médicale et pharmacodynamie
FLANDROIS	Physiologie
VIALIER-RAYNARD	Bactériologie
ROLLET	Pharmacie galénique

AGREGES EN EXERCICE

MM.

BONAMOUR	Ophtalmologie
de MOURGUES Georges	Chirurgie générale
DEVIC	Médecine générale
DUMONT Martial	Obstétrique
DURAND	Urologie
FRANCILLON	Chirurgie générale
SAUBIER	Chirurgie générale
SCHOTT	Neuro-psychiatrie
ALLEGRE	Neuro-chirurgie
CHASSARD	Electro-radiologie
FAYSSE	Orthopédie
GAILLARD	Oto-rhino-laryngologie
GARDE	Médecine générale
HUGONNIER	Ophtalmologie
MARET	Chirurgie générale
MORNEX	Médecine générale
NORMAND	Médecine générale
PERRIN André	Médecine générale
DUMAS	Stomatologie
GARMIER	Obstétrique
NOEL	Médecine générale
SCHNEPP	Orthopédie

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : M. le Professeur A. CIER
Assesseurs: M. le Professeur B. DREVON
M. le Professeur Agrégé J. GRAS
M. le Professeur Agrégé FLANDROIS

A LA MEMOIRE DE MES PARENTS

A MA FEMME

A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE
Monsieur le Professeur A. CIER
Chevalier de la Légion d'Honneur

Nous le remercions de l'aide qu'il nous a prodiguée dans la réalisation de notre travail. Sa sympathie et ses encouragements en toutes occasions furent pour nous d'un grand réconfort. Nous le prions de trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour son précieux enseignement tant au cours de nos études que de notre vie au laboratoire.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

Monsieur le Professeur B. DREVON
Officier de la Légion d'Honneur

Il nous a très cordialement accueilli
voici plus de quatre ans. Nous le re-
mercions de la confiance qu'il a tou-
jours su nous témoigner dans la vie
du laboratoire. Son enseignement clair
et précis restera toujours pour nous
un exemple d'efficacité.

Monsieur le Professeur Agrégé J. GRAS

Nous le remercions d'avoir accepté de
faire partie de notre jury de thèse ;
il nous donne là une marque d'estime
à laquelle nous sommes très sensible.

Monsieur le Professeur Agrégé FLANDROIS

Il nous fait l'honneur de bien vou-
loir juger notre travail. Nous le
prions de bien vouloir trouver ici
l'assurance de notre sincère gratitu-
de.

INTRODUCTION

Ce travail a pour objet l'étude critique des tests permettant de mettre en évidence chez l'animal un pouvoir hépatoprotecteur. Il nous est apparu en effet, devant la multiplicité des techniques proposées, qu'un choix s'imposait pour établir un protocole de triage valable des substances présentant une telle activité.

Dans cette optique nous nous sommes limités à créer chez le petit animal de laboratoire des hépatites expérimentales par des procédés à la fois simples et rapides, et nous avons cherché à évaluer ces atteintes tant sur le plan quantitatif que qualitatif au moyen de tests et dosages se prêtant à des essais en grande série.

Le problème des hépatites expérimentales en pharmacologie n'est pas nouveau. Cependant, d'après les données fort nombreuses de la littérature, chaque auteur met en oeuvre son propre protocole expérimental sans toujours le justifier, et en général la gravité de l'hépatite ainsi créée est évaluée grâce à des tests divers de significations différentes. Comparer entre eux les résultats de deux auteurs est dans ces conditions très difficile. Très fréquemment du reste le critère retenu est l'examen histologique mais les délais imposés sont alors incompatibles avec les impératifs d'une épreuve de triage.

Dans un premier chapitre nous allons étudier et discuter les différentes modalités d'obtention de s hépatites expérimentales avant de définir pour chacune

d'entre elles le protocole adopté. Nous passerons ensuite en revue les tests et dosages biologiques permettant dans la mesure du possible de quantifier l'atteinte fonctionnelle alors créée. Dans une troisième partie nous réunirons l'ensemble des résultats obtenus dont la discussion nous a conduit à proposer un protocole d'étude de triage de substances hépatotropes.

INTRODUCTION

A - GENERALITES

B - ETUDE EXPERIMENTALE

Chapitre I

CREATION DE L'ATTEINTE DE L'HEPATOCYTE

I - 1 Les hépatites nutritionnelles

I - 2 Les hépatites toxiques

I-2.1 Stéatose à l'éthionine

I-2.2 Hépatites au tétrachlorure de carbone

I-2.3 Thioacétamide et nécrose hépatique

I-2.4 Stéatose au phosphore

I-2.5 Hépatites au chloroforme

I-2.6 Hépatite au bromobenzène

I-2.7 Hépatite à l'alcool éthylique

Chapitre II

EVALUATION DE L'ATTEINTE CELLULAIRE

II - 1 Dosage des lipides hépatiques

II - 2 Dosage des enzymes sériques

II - 3 Tests à la B.S.P.

Chapitre III

RESULTATS

- III - 1 Hépatites diététiques
 - III - 1.1 Etude quantitative
 - III - 1.2 Etude qualitative

- III - 2 Hépatites à l'éthionine
 - III - 2.1 Atteinte aiguë par voie sous-cutanée
 - III - 2.2 Atteinte subaiguë par voie orale

- III - 3 Hépatites au tétrachlorure de carbone
 - III - 3.1 Atteinte par voie sous-cutanée
 - III - 3.2 Atteinte par inhalation

- III - 4 Hépatites à la thioacétamide
 - III - 4.1 par voie sous-cutanée
 - III - 4.2 par voie orale

- III - 5 Hépatites au phosphore

- III - 6 Hépatites au bromo-benzène

- III - 7 Hépatites à l'alcool allylique

- III - 8 Hépatites à l'éthanol

C - DISCUSSION DES RESULTATS

- Protocole proposé

CONCLUSIONS

GENERALITES

Malgré l'importance de la sécrétion biliaire, le foie des vertébrés supérieurs a pour fonction principale d'arrêter, d'emmagasinier, de modifier ou de transformer les nombreuses substances que lui amène la veine porte. Ce rôle considérable du foie dans la fonction vitale de l'organisme est de plus en plus mis en évidence grâce à l'évolution des techniques physiologiques, biochimiques et histologiques.

Sur le plan clinique, le terme d'hépatite désigne un groupe de maladies aiguës ou chroniques dans lesquelles la dégénérescence hépatocellulaire ou la nécrose sont associées à des lésions inflammatoires mésenchymateuses bien que les modifications de l'hépatocyte prédominent sur le plan fonctionnel et parfois morphologique. Toutes les tentatives de classification se sont fondées sur des arguments anatomiques, étiologiques ou cliniques que les auteurs ont utilisés soit isolément, soit associés deux à deux.

Les critères anatomiques ne manquent pas :

- macroscopiques, ils ont permis de distinguer dans les cirrhoses différents types selon le volume du foie (atrophiques ou hypertrophiques), ou la constitution des nodules (mono- ou pluri-lobulaires);

- microscopiques, ils ont incité beaucoup d'auteurs à décrire des cirrhoses capsulaires, centrales, diffuses, périportales...

Les critères étiologiques paraissent plus valables mais ils sont en général imbriqués les uns dans les autres.

En clinique, on connaît particulièrement les hépatites d'origine virale qui vont donner des cirrhoses post-nécrotiques, l'alcoolisme responsable des cirrhoses septales et la dénutrition souvent à l'origine des cirrhoses biliaires.

Les cirrhoses nutritionnelles humaines ont le même aspect histologique que les cirrhoses alcooliques et elles atteignent les sujets carencés depuis longtemps en protides, en protides animaux surtout. On peut donc les rapprocher des cirrhoses expérimentales obtenues chez l'animal par des régimes carencés en acides aminés.

HISTOGENESE DE LA CIRRHOSE

Des processus lésionnels différents prenant leur origine dans chacun des tissus constitutifs du foie peuvent mener à la cirrhose. Ils sont assez bien connus depuis que de véritables cirrhoses nutritionnelles ou toxiques, anatomiquement comparables à celles de l'homme, ont pu être réalisées chez l'animal. Ces processus sont mis en évidence dans le cas d'hépatites virales caractérisées dans leurs manifestations habituelles par une dégénéscence cellulaire hépatique simple, une nécrose et une infiltration de mononucléaires, ces modifications s'étendant d'une manière presque diffuse à tout le lobule hépatique. Cependant les altérations parenchymateuses diffuses d'origine toxique, nutritionnelle ou infectieuse, et même celles qui sont liées à la stase biliaire sont aussi appelées conventionnellement "hépatites". Dans ces conditions la réaction mésenchymateuse peut être primitive, mais elle apparaît souvent comme secondaire à une maladie des cellules hépatiques, comme par exemple, l'infiltration leucocytaire au cours des remaniements dégénératifs du foie gras des alcooliques.

Par cirrhose, le clinicien désigne un état, avec ou sans lésion cellulaire, caractérisé par un ralentissement fonctionnel du foie, une hypertension portale et souvent une ascite. Les altérations fonctionnelles sont dues à deux causes :

- Le nodule régénératif et le septum du tissu connectif qui relie les espaces porte aux plages de parenchyme. Ces nodules régénératifs créent par compression une hypertension portale aggravée par l'anastomose des systèmes porte - artère hépatique au niveau du septum du tissu connectif qui transmet la pression artérielle dans la veine porte.

- des dérivations par anastomoses veineuses intra-hépatiques qui "court-circuitent" la vascularisation du parenchyme hépatique et expliquent ainsi conjointement avec les collatérales veineuses extra hépatiques porto-cave la diminution de la quantité de sang irriguant l'organe. (176)

Le septum qui unit les vaisseaux porte et hépatiques dans la cirrhose, créant ou aggravant l'atteinte cellulaire indépendamment de son étiologie, constitue ainsi l'expression morphologique de l'irréversibilité du processus cirrhotique.

Le tableau qui vient d'être décrit représente en général l'évolution terminale de l'atteinte hépatique. La cirrhose est toujours précédée d'états plus ou moins nets qui sont : la stéatose, la cytolyse, la nécrose et la fibrose.

La stéatose ou infiltration graisseuse est une des premières manifestations d'une atteinte sérieuse. Elle peut représenter une phase relativement longue, comme dans le cas des stéatoses nutritionnelles ou bien céder très rapidement la place à une nécrose. C'est à la suite des travaux des écoles de BEST et CHANNON qu'a été souligné le rôle du foie dans le stockage des graisses chez les mammifères. (24)

Le taux des lipides hépatiques peut être considéré comme la résultante d'un équilibre dynamique entre l'apport des lipides au niveau du foie, leur oxydation in situ et leur élimination. Nous étudierons plus loin l'étiologie et les troubles métaboliques accompagnant les stéatoses.

A côté du syndrome excréto-biliaire qui concerne la fonction externe du foie, les troubles métaboliques peuvent se classer en deux grands groupes :

- l'un constitue l'expression pathologique du foie absent; c'est le syndrome hépatoprive qui rassemble les tests de déficit cellulaire de l'insuffisance hépatique proprement dite.

- l'autre traduit la pathologie du foie présent, c'est-à-dire des conséquences biologiques de l'agression hépatique.

Dans ce dernier se place le "syndrome de cytolyse" qui traduit les conséquences de la lésion des cellules épithéliales. Des travaux récents sont venus donner à ce syndrome une expression biologique plus précise et plus complète.

En effet, les perturbations témoignant de la lyse cellulaire hépatique, quelle qu'en soit l'étiologie, paraissent être le reflet des modifications métaboliques des hépatocytes, qui initialement réversibles, aboutissent, si elles persistent, à des images bien connues depuis longtemps des anatomo pathologistes. A ce stade morphologique est réservé le nom de nécrose.

On attribue le terme de cytolyse à l'ensemble des modifications qui, au niveau cellulaire vont du stade biochimique prémorphologique à la nécrose. Ce syndrome sera plus largement étudié sur le plan enzymatique.

La nécrose qui entre en jeu à la suite du syndrome de cytolyse est la manifestation commune à toutes les atteintes hépatiques graves. Elle peut être accompagnée, ou précédée, de la stéatose et elle aboutit à une cirrhose si l'agression est chronique et dure assez longtemps.

La fibrose correspond à un processus réactionnel dont l'installation suit la nécrose ou la stéatose et va de pair avec l'état cirrhotique.

Quand à la cirrhose, dont nous avons rapidement rappelé le côté anatomopathologique, elle représente comme nous l'avons dit, un état final assez complexe caractérisé par des processus de fibrose et de nécrose.

Les cirrhoses expérimentales sont de deux types : l'histologiste distingue en effet les cirrhoses avec fibrose cicatricielle ou diffuse.

Depuis que certaines maladies ont été définies comme la cirrhose de LAENNEC ou la stase biliaire, un grand nombre d'expérimentateurs se sont proposés de reproduire chez l'animal des atteintes analogues et la tentative était d'autant plus justifiée que ces affections se rencontrent spontanément dans de nombreuses espèces animales; on connaît la lupinose du mouton rapidement mortelle, la maladie de SCHWEISBERG du cheval, les nécroses hépatiques massives du bétail se nourrissant de céréales poussant sur des sols riches en sélénium.

D'une manière générale, il faut noter que les hépatites, qu'elles soient toxiques ou nutritionnelles, aboutissent toujours à une cirrhose à condition que l'intoxication soit suffisamment longue et bien dosée. Quoiqu'il en soit, les lésions cirrhotiques résultent d'un état où prédomine soit la nécrose soit l'infiltration de l'hépatocyte.

La nécrose est d'origine nutritive, vasculaire ou toxique, ces deux dernières étant souvent imbriquées. Les lésions de nécrose se limitent généralement à certaines régions du parenchyme; elles sont réparties dans tous les lobules hépatiques mais n'intéressent que certaines zones de ces lobules (nécrose zonale).

Dans un article paru en 1959 sur les cirrroses hépatiques expérimentales, DUBRISAY et DARNIS classaient celles-ci en :

1. cirrroses diététiques
2. cirrroses toxiques
3. cirrroses par surcharge métallique
4. cirrroses d'origine endocrinienne
5. cirrroses par cholostase
6. hépatopathies par perturbations vasculaires et circulatoires
7. périhépatites constrictives
8. hépatopathies par irritation du système nerveux autonome.

Le but de notre travail était de mettre au point un processus d'intoxication facilement reproductible et permettant ainsi une étude préliminaire de triage (*) de médicaments hépatotropes et nous avons orienté nos recherches expérimentales sur des techniques permettant d'obtenir des hépatites diététiques et toxiques.

Nous avons déjà fait état de la diversité des protocoles proposés et du nombre des composés présentant une hépatotoxicité plus ou moins sélective. L'abondance des travaux souvent contradictoires publiés dans ce domaine nous a beaucoup plus desservis qu'aidés.

La découverte du pouvoir hépatotoxique des carences alimentaires date de la fin du siècle dernier. De-

(*) De tels essais portent souvent le nom de "screening".

puis longtemps, on connaissait les maladies de la famine et l'on soupçonnait le rôle de facteurs alimentaires dans certaines affections. Le XIX^e siècle, appliquant les découvertes de LAVOISIER et négligeant toute notion de besoin spécifique, simplifia à l'extrême les problèmes de l'alimentation et n'en retint que l'aspect quantitatif, calorique, assimilant l'organisme à une machine thermique. La notion d'un besoin qualitatif en certains aliments demeurait empirique.

Puis survint la découverte des vitamines, des hormones pancréatiques et la notion, subjective jusqu'alors, de carence et de déséquilibre prit une assise scientifique. Ce fut la découverte des acides aminés indispensables, du minimum azoté, des acides gras essentiels, etc... chacun des éléments formant du reste un paramètre indépendant des autres. Aussi l'étude des hépatites carencielles est-elle très compliquée en raison justement du nombre de ces paramètres.

Nous nous sommes limités aux facteurs les plus influents et à l'apparition d'une stéatose; nous avons étudié les effets de régimes déséquilibrés par une carence ou un excès de protides et de lipides. Nous avons également pour ces derniers, envisagé le rôle joué par la nature des acides gras qui les constituent. Ce travail a été effectué sur la souris qui autorise plus facilement la constitution de lots homogènes et importants.

Dans le cadre des hépatites expérimentales carencielles ou diététiques, que l'animal soit la souris ou le rat, quatre paramètres se retrouvent toujours.

1. L'espèce et la souche de l'animal (58)
2. Le sexe
3. L'âge
4. L'état nutritionnel.

A ceux-ci on peut ajouter des facteurs externes, notamment l'ambiance de l'animalerie : le froid peut indirectement diminuer l'action d'un produit ou d'un régime stéatosant, ou au contraire créer momentanément une stéatose chez des animaux témoins, évolution qui s'atténue rapidement par une participation accrue des graisses aux dépenses énergétiques.

L'état nutritionnel de l'animal, au départ d'une

expérimentation par régime, qui dure souvent plus d'une semaine, a peu d'importance mais il est presque capital lors d'une intoxication aiguë. En effet, des animaux à jeûn depuis plus de 24 heures sont beaucoup plus sensibles et la cinétique des processus biochimiques qui témoignent de l'effet toxique est complètement perturbée. Nous avons pour notre part pris, dans toutes nos expérimentations, des animaux soumis à un régime normal, *ad libitum*, et ce pour diminuer autant que possible l'influence de ce paramètre.

D'autres facteurs, plus nuancés mais cependant très nets, peuvent modifier les réponses. Parmi ceux-ci, même pour une souche donnée garantie par l'éleveur la provenance de l'animal peut présenter une certaine importance et nous verrons plus loin dans le cas de régimes à l'éthionine combien ce facteur a perturbé nos résultats. La saison à laquelle nous soumettons l'animal à un régime stéatogène peut, elle aussi, jouer un rôle, et nous avons constaté à la lumière de quatre années d'expérimentations que pour un régime donné, des animaux de souche, sexe et provenance identiques, l'activité stéatogène des régimes était supérieure en hiver qu'en été.

Il semble ainsi démontré combien les conditions expérimentales que nous préciserons plus amplement dans chaque chapitre, jouent un rôle important dans la création des hépatites expérimentales. Aussi, comme dans beaucoup d'autres essais pharmacologiques, nous avons toujours utilisé un grand nombre d'animaux triés au préalable et répartis en deux lots, l'un servant de témoin à chaque stade de l'essai.

A côté des hépatites expérimentales nutritionnelles, les hépatites toxiques représentent un chapitre inépuisable si l'on considère le nombre des agents toxiques que l'on peut envisager et la diversité des lésions produites (75). On peut classer ces toxiques en fonction de leur parenté chimique ou bien compte-tenu des lésions induites (204); mais rejoignant SCHWARTZMANN dans sa revue générale sur les hépatites toxiques expérimentales nous pensons que les classer par ordre alphabétique n'est pas, tout compte fait, plus arbitraire. Nous avons réuni dans le tableau I (page 15) emprun-

té à HARTROFT les agents toxiques utilisés en pathologie hépatique expérimentale; nous avons simplement ajouté à cette liste la thioacétamide à laquelle nous avons consacré une partie de notre travail et les composés organiques cancérigènes utilisés au laboratoire pour obtenir des carcinomes hépatocellulaires (219).

L'historique des hépatites toxiques expérimentales nous a fait remonter assez loin. Après les observations de NORTHNAGEL en 1866 sur la toxicité du chloroforme, il faut cependant attendre le début du siècle pour que les effets de cet anesthésique soient nettement définis (241).

Les expériences ont été reprises un peu plus tard avec le tétrachlorure de carbone (CCl_4) par HALL puis MEYER (108) (153). Depuis, les travaux se sont multipliés sur l'hépatotoxicité de ce dérivé chloré et nous lui avons consacré nous-même tout un chapitre de ce travail.

Mais en dehors du tétrachlorure de carbone, une foule de substances fut essayée, que l'on peut classer grossièrement en toxiques minéraux et toxiques organiques. Dans le premier groupe, figurent les dérivés de l'arsenic, le selenium et le phosphore; dans le second, les hydrocarbures halogénés et une série de divers composés sans parenté aucune comme l'éthionine, la thioacétamide, les phalloïdines, l'acide tannique, etc... On peut aussi classer les toxiques en ceux provoquant des nécroses hépatiques immédiates (hydrocarbures chlorés), et ceux responsables de nécroses hépatiques tardives comme le sélénium dont le syndrome clinique et anatomopathologique a été bien étudié par NOXON et RHIAN (157).

Mais de façon générale, il n'y a pas de cloisonnement entre ces deux groupes; le tétrachlorure de carbone par exemple, chef de file des toxiques donnant des hépatites aiguës, peut, s'il est administré à faible dose et pendant un temps suffisamment prolongé, déterminer des hépatites chroniques. Dans un tel essai la durée et surtout la régularité dans l'administration du toxique sont essentielles à sa réussite (CAMERON et KARANURATNE 48). Ces auteurs ont observé qu'en administrant du CCl_4 à dose modérée à des rats en espaçant les injections de 10 jours ou davantage, on n'observe

TABLEAU I

TOXIQUE	LESION PRODUITE	TOXIQUE	LESION PRODUITE
Alc. allylique	Nécrose	Ethylène (dichlorure)	Stéatose
Amanite Phalloïde	Stéatose-nécrose	Ethyl méthane	Cirrhose Cancer
Arsenic	Nécrose central. Fibrose	Halothane	Stéatose Nécrose
Acétamino- fluorène	Cancer	o.amino- benzène	Cancer
B.A.L.	Nécrose	p.dimethyl amino- azo benzène	Cancer
Benzène	Stéatose		
Bromobenzène	Stéatose Fibrose péripat.	Plomb	Nécrose Cirrhose
Carbone (tétrachlo- rure)	Stéatose Nécrose central. Cirrhose Cancer	Phosphore	Stéatose Nécrose central.
Chloroforme	Stéatose Nécrose central.	Pyridine	Stéatose Cirrhose
D.D.T.	Nécrose Stéatose	Sélénium	Stéatose Nécrose Cirrhose Cancer
Dicetyl amino fluorène	Cancer	Tannate de Na	Nécrose Cancer
Ethionine	Stéatose Tumeur	Thioacétamide	Nécrose Cancer
		Trinitroben- zène	Stéatose Nécrose central.
		Trichloréthy- lène	Stéatose

jamais de cirrhose mais des lésions de nécrose banale qui ont le temps de se réparer sans laisser de trace dans l'intervalle de deux injections. Si au contraire, les injections sont plus rapprochées, une fibrose hépatique diffuse apparaît. Même à ce stade de l'expérience tout peut rentrer dans l'ordre, fibrose comprise, si l'on suspend les injections. Dans le cas contraire la fibrose devient progressivement plus dense et il arrive un moment où elle continuera d'évoluer pour son propre compte jusqu'à la dégénérescence totale du tissu hépatique même si l'intoxication est arrêtée. Les doses à administrer à chaque injection peuvent être très variables, mais il faut noter qu'il existe une dose seuil pour la plupart des toxiques : ainsi chez le rat mâle, pour le tétrachlorure de carbone, une injection à 100 mg/Kg aura autant d'action qu'une injection à 3 grammes/Kg, mais la dose de 30 mg/Kg n'aura aucun effet. (153)

Mais qu'ils soient administrés à forte dose pour donner une hépatite aiguë ou à faible dose pour aboutir à une hépatite chronique, le mode d'action des différents toxiques est très varié. Les principaux facteurs des atteintes provoquées sont vasculaires, ou diététiques; leur importance relative est fonction du toxique mis en jeu. Ainsi le tétrachlorure de carbone entraîne, 15 minutes après son injection, une vasoconstriction immédiate des sinusoides qui dure 24 heures (238). Il s'ensuit une ischémie qui non exclusive suffit à produire la nécrose. Du reste, plus encore que l'ischémie, l'anoxie semble être dans l'immédiat la cause principale des lésions cellulaires. Les facteurs diététiques sont évidemment les mêmes que ceux rencontrés dans les hépatites carentielles. Le rôle des lipides est très important et il n'est pas d'exception à la règle qui veut que toute intoxication hépatique soit aggravée par l'adjonction d'un régime riche en graisse ou simplement privé des facteurs lipotropes.

Cette action aggravante de l'infiltration graisseuse sur la plupart des intoxications hépatiques a conduit à rechercher si, dans ces conditions, la choline ou la méthionine, administrées en même temps que le toxique auraient un effet protecteur et préventif comparable à celui qui lui a été reconnu dans les stéatoses de régime. Il semble qu'il n'en soit rien; par exemple, la

choline est dénuée d'effet protecteur dans l'intoxication par le chloroforme, le tetrachlorure de carbone et le phosphore. (27) (115) (105).

Mais, si complexe que soit le rôle des lipides dans leurs rapports avec les hépatites toxiques, celui des protéines et des acides aminés l'est encore plus. Du reste, c'est à ce niveau que nous trouvons des toxiques qui permettent de faire le pont entre les hépatites nutritionnelles et les hépatites toxiques. Le rôle joué par les réserves protidiques dans les intoxications hépatiques et leur efficacité dans la protection du parenchyme a été surtout mis en évidence par WHIPPLE et ses collaborateurs (241). Ces auteurs ont insisté sur la relation entre la teneur du foie en soufre total et la résistance de l'organisme à l'administration du chloroforme. Les acides aminés soufrés (cystine et méthionine) administrés avant l'anesthésie chloroformique protègent efficacement le parenchyme hépatique (115).

Pour WHIPPLE, la gravité et l'extension des lésions hépatiques par intoxication chloroformique sont liées à l'état du métabolisme protéique et le chloroforme perturbe un système enzymatique en bloquant les groupements sulfhydriles qui interviennent dans les processus d'oxydo réduction cellulaires.

C'est pourquoi certains auteurs se sont demandés si les toxiques hépatiques n'agissaient pas en fin de compte en inactivant les groupements - SH ou en inhibant les enzymes qui en sont porteurs. Plusieurs faits expérimentaux sont venus étayer cette hypothèse. Dans tous les cas, l'intoxication est aggravée si elle s'accompagne d'une carence en méthionine, cystine et α tocopherol; elle est atténuée au contraire si l'animal est soumis à un régime comportant ces trois composés dans des proportions convenables. Il a été du reste montré, in vitro, que certains toxiques chlorés inhibent les enzymes porteurs de groupements SH; d'autre part il est possible d'obtenir des intoxications prononcées chez des animaux soumis assez longtemps à un régime riche en selenium. L'hépatite ainsi obtenue, après un temps de latence variable se rapproche beaucoup de la nécrose diététique consécutive à des régimes carencés en acides aminés soufrés. De là à penser que le sélénium peut, en se substituant au soufre, conduire à une carence en acides aminés soufrés, il n'y avait qu'un pas qui fut

franchi par PAINTER (170). Cependant, le problème semble infiniment plus complexe : des travaux récents ont montré que de petites quantités de sélénium, sous forme de sélénite de sodium, incorporées au régime à la dose de 10 μ g/kg avaient un effet lipotrope vis à vis de rats femelles intoxiquées au CCl_4 et à l'inverse une action synergique lorsqu'il s'agissait d'intoxications à l'éthionine (195). Dans ce dernier cas, il est vrai, le problème est différent : l'éthionine, dont on étudiera plus loin l'action, inhibe la conversion in vitro de la méthionine radioactive en glycine et, en suivant l'incorporation de l'éthionine dans les protéines, de nombreux auteurs ont pu démontrer qu'elle donnait lieu à la formation de protéines anormales.

Cette conception trophopathique du mécanisme d'action de certains toxiques a l'intérêt de mettre une fois de plus l'accent sur les rapports qui unissent les intoxications et les carences dans le déterminisme des lésions du foie. Ainsi s'explique la similitude des lésions obtenues dans les deux groupes d'essais et l'influence de la nature du régime alimentaire sur la gravité des intoxications.

Dans le cas de la plupart des essais pharmacologiques, créer une atteinte fonctionnelle n'est pas suffisant, il faut encore pouvoir l'évaluer de façon à la suivre dans le temps.

Nous l'avons vu, les critères et définitions de divers types d'atteinte hépatique reposent en général sur des données anatomo-pathologiques. Certes, en pharmacologie où des prélèvements du foie sont évidemment plus faciles qu'en clinique, l'histologie représente le plus sûr moyen d'évaluation d'une atteinte ou d'une protection hépatique.

Cependant, notre travail ayant pour objet la mise au point d'un protocole simple et donnant des résultats rapides, nous avons recherché toujours avec un souci

d'efficacité, parmi les nombreux tests ou dosages proposés ceux qui permettaient de se faire une idée relativement précise et statistiquement acceptable de la valeur de la masse fonctionnelle hépatique chez des animaux, rats et souris, présentant une hépatite toxique ou nutritionnelle.

ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE I

CREATION DE L'ATTEINTE

DE L' HEPATOCYTE

I - 1

LES HEPATITES
NUTRITIONNELLES

Les premières techniques utilisées pour créer une cirrhose expérimentale, ligature des vaisseaux hépatiques, ligature des voies biliaires sont les moins simples et sans doute les moins physiologiques et elles ont laissé la place à d'autres techniques basées sur l'emploi de toxiques minéraux et organiques. Ce n'est que vers 1925 en effet que la notion de déséquilibre et de carence a pu être rattachée à l'étiologie de la cirrhose.

Comme l'indique SPELLBERG dans son ouvrage sur les maladies du foie, la découverte du pouvoir hépatotoxique des régimes carencés a été une conséquence de la découverte de l'insuline (13). Dès 1924, ALLAN a observé que l'insuline fait disparaître une stéatose primaire sur des chiens dépancréatés et maintenus en survie, mais non une stéatose secondaire, celle-ci ne régressant qu'avec l'ingestion régulière de pancréas frais. L'influence d'une hormone lipocœlique a d'abord été évoquée (DRAGSTEDT) mais une longue série de travaux (BEST) a démenti cette hypothèse : l'action des extraits pancréatiques ou de l'organe frais est liée à la présence de choline retrouvée par ailleurs dans d'autres substances jugées également lipotropes à l'époque et notamment des lécithines (21) (22) (23) (24) (116). Soumettant des rats à un régime hyperlipidique et hypoprotéique, BEST obtenait une stéatose prévenue ou guérie par administration de choline; ce composé a été jusqu'en 1937 le facteur lipotrope princeps. Les conditions expérimentales choisies conduisent à une stéatose, ce qui explique que les facteurs étudiés ont été toujours qualifiés de lipotropes; mais si on continue ces régimes pendant suffisamment de temps, on aboutit à une véritable cirrhose hépatique relativement proche des cirrhoses humaines. (29) (30).

A partir de 1937 les travaux de DU VIGNEAUD et quelques années plus tard, les recherches ayant trait à l'action de l'éthionine, ont démontré l'activité d'un nouveau composé lipotrope, la méthionine, mettant l'accent sur l'importance des radicaux sulfuryl et méthyl

(26) (59) (78) (79) (104). Depuis, le problème a pris de l'ampleur et les recherches récentes ont montré qu'il s'agissait plus d'une notion de déséquilibre que de carence dans le domaine des vitamines, des acides aminés, et des proportions des acides gras présents dans les lipides. Les progrès réalisés en biochimie et en histochimie ont permis d'étudier la répercussion de ces déséquilibres jusque dans les ultra structures de la cellule et d'étayer les hypothèses aussi nombreuses que complexes qui ont été proposées sur les séquences amenant à la stéatose puis à la cirrhose. La nécrose obtenue par déficit protéique serait due à une déficience en cystine (158) (222) et serait prévenue par la vitamine E (206). Administrée dans le régime à forte concentration, la vitamine B₁ est douée d'un pouvoir stéatogène; cet effet serait renforcé par la vitamine B₂ et, ce qui est plus paradoxal, par la cystine (149). Cependant la vitamine B₁₂ additionnée à certains régimes aurait un effet lipotrope (10) (228) et l'inositol, autre vitamine du groupe B aurait un effet semblable au moins dans certaines conditions expérimentales (19). CHERNICK et SCHWARTZ ont obtenu également une nécrose hépatique avec un régime à base de levure de torula, dépourvue de cystine et de vitamine E.

Mais si, quantitativement et qualitativement par la présence ou non d'acides lipotropes (65), les protéines dans un régime stéatogène ont une importance capitale, il ne faut pas oublier qu'il en est de même pour les lipides chez lesquels il existe aussi un double problème qualitatif et quantitatif (17).

Ce furent BEST et CHANNON qui, nous l'avons déjà dit, furent les premiers à provoquer des stéatoses par déséquilibre alimentaire. Un régime riche en graisses n'est pas stéatogène s'il contient un taux élevé de protéine, mais l'intensité de la stéatose varie avec la graisse ingérée et surtout la longueur de la chaîne des acides gras qu'elle renferme : très élevée avec des triglycérides d'acides gras à chaîne longue (supérieure à 14 atomes de carbone) elle est beaucoup plus faible lorsque les lipides utilisés sont constitués d'acides gras à chaîne courte (inférieure à 12 atomes de carbone).

Pour tenter de saisir le mécanisme des stéatoses il est nécessaire de situer le rôle du foie dans le

métabolisme lipidique. La digestion apporte d'une part des mono- di- et triglycérides et leur produit d'hydrolyse, des acides gras libres. D'autre part, sont assimilés des esters de cholestérol formés à partir des acides gras et du cholestérol biliaire. Les problèmes posés par le passage de la barrière intestinale ne sont pas définitivement résolus : il n'est pas encore prouvé notamment que seuls les lipides phosphorylés soient directement assimilables. Après avoir traversé la muqueuse intestinale les lipides sont entraînés soit dans le système porte soit dans les lymphatiques : les triglycérides d'acides gras à chaîne longue (supérieure à 14 atomes de carbone) passeraient par la voie lymphatique et ceux à chaîne courte (inférieure à 12 atomes de carbone) seraient entraînés directement dans le sang. Le foie recevrait donc indirectement les premiers, directement les seconds avec en plus des triglycérides en provenance des dépôts graisseux, mélangés à des esters du cholestérol.

Arrivés au foie, les triglycérides sont en majeure partie oxydés in situ. De nombreux travaux amènent à penser que cette oxydation se fait sous forme de phosphatides dont le renouvellement rapide est nécessaire pour assurer un catabolisme normal des acides gras. On sait que la principale voie d'oxydation est la β -oxydation (KNOOP) qui aboutit à la formation d'acide acétique et de corps cétoniques s'il ne se forme pas assez d'acide oxalacétique au cours du catabolisme glucidique. A côté de cette oxydation lipidique le transport sous forme de phosphatides des graisses du foie vers la périphérie est beaucoup plus discuté (144).

Les stéatoses d'origine diététique peuvent avoir pour origine un dysfonctionnement du métabolisme lipidique (144) lié à :

- I - des troubles de la mobilisation
- II - des troubles du catabolisme
- III - des troubles du transfert des graisses du foie vers les tissus de réserve.

I - Il a été possible de constater une mobilisation exagérée des graisses de dépôt vers le foie soit après pancréatectomie, soit au cours du jeûne, soit après injection de C Cl_4 .

II - Les troubles du catabolisme peuvent être dus à une forte diminution de l'activité des enzymes hépatiques oxydant les acides gras ce qui est très net dans le cas des régimes hypoprotéiques - hyperlipidiques ou lors des intoxications au tétrachlorure de carbone. Ils peuvent aussi correspondre à la cétogénèse car l'animal stéatosé utilise encore les graisses que lui apporte le régime et de nombreux travaux ont montré qu'au cours du jeûne suivant l'installation d'une stéatose, l'animal voit considérablement augmenter le taux des composés cétoniques à la fois dans le sang et les urines. Mais d'après LEVY, les perturbations du catabolisme sont dues surtout à un renouvellement ralenti des phosphatides et aux troubles du métabolisme glucidique (145) (146).

Ces données sont encore très incomplètes et le *primum movens* du processus toxique est loin d'être défini. L'étude du métabolisme intime de l'hépatocyte a montré que la carence protéique et principalement celle de ses groupements sulfuryl et méthyl, agissant au niveau de la synthèse enzymatique (enzymes respiratoires, enzymes entrant dans le catabolisme lipidique) provoquait la réaction en chaîne conduisant à la stéatose, la nécrose et enfin la cirrhose post-nécrotique.

Sur le plan technique il est impossible de donner ici une analyse complète des multiples "recettes" qui ont permis de produire des cirrhoses diététiques expérimentales (247) (237). Voici résumés en un tableau (page 30) les trois paramètres étudiés par les auteurs.

Ces différents régimes ont en général été étudiés chez le rat ou le chien (57). Nous avons pour notre part choisi de suivre l'évolution de la stéatose chez la souris, dans le souci de mettre au point une technique rapide, simple et par laquelle on pouvait obtenir des résultats significatifs.

TABLEAU II

AUTEURS	COMPOSITION DU REGIME			ATTEINTE REALISEE
	GLUCIDES	LIPIDES	PROTIDES	
RICH - HAMILTON GYORGY - GOLDBLATT HIMSWORTH - GLYNN	Riche	Pauvre	Pauvre	Stéatose Nécrose puis Fibrose
BEST PATEK	Equilibré	Equilibré	Pauvre	Stéatose, Fibrose et nécrose + rapide et impor- tante sui- vant la carence en protides
SPELLBERG	Normal	Riche	Normal	Stéatose longue à obtenir
CHAIKOF - EICHORN BLUMBERG JUSTIN-BESANCON SAVEL	Normal	Riche	Pauvre	Stéatose diffuse avec évolution cirrhogène rapide

JUSTIN-BESANCON et son équipe ont déjà étudié chez la souris l'évolution de la stéatose hépatique avec des régimes carencés en protéines et démontré dans ces conditions expérimentales l'action lipotrope de la méthionine et de la phosphoryl choline (126).

Dans des conditions expérimentales proches de celles de ces auteurs, nous avons analysé l'influence des différents facteurs tant quantitatifs que qualitatifs sur l'installation, chez la souris, de l'infiltration graisseuse hépatique.

La durée du traitement a été, en général, au maximum de dix jours. Les compositions centésimales des différents régimes sont consignées dans le tableau III.

T A B L E A U I I I

	COMPOSITION DES REGIMES EN %					
	HYPO- PROTEIQUE	HYPER- LIPIDIQUE	HYPOPROTEIQUE-HYPERLIPIDIQUE			
	1	2	3 A	3 B	3 C	3 D
PROTIDES	Caséine 3	Caséine 20	Caséine 3	Caséine 3	Caséine 3	Caséine 3
LIPIDES	Margar. 17	Margar. 50	Margar. 50	Margar. 49,5 + Choles- térrol 0,5	Saïndoux 50	Huile de Tournesol 50
GLUCIDES	Saccha- rose 75	Saccha- rose 25	Saccha- rose 42	Saccha- rose 42	Fécule 42	Fécule + Saccha- rose 42
SELS (mélange d'Orent)	5	5	5	5	5	5

Nous avons utilisé comme protéine la caséine du commerce dont la composition en acides aminés est assez constante. Nous avons, avant cette série d'essais étudié l'importance des vitamines dans un régime équilibré et ce pour une durée de 10 jours... Les résultats identiques obtenus nous ont permis d'omettre volontairement celles-ci.

Les sels introduits dans les régimes à la concentration de 5 %, correspondent au mélange d'Orent n° 22 dont la composition centésimale est la suivante:

CO_3Ca	: 10,8	INa	: 0,0015
$\text{PO}_4\text{HCa}, 2\text{H}_2\text{O}$	: 7,2	SiO_3Na_2	: 0,35
ClK	: 8,5	$\text{SO}_4\text{Fe}, \text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	: 0,70
SO_4Mg	: 5	SO_4Cu	: 0,25
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$	: 11,4	SO_4Mn	: 0,05
ClNa	: 12,4	Cl_2Mn	: 0,10

Pour les glucides nous avons employé soit la saccharose, soit la fécule, soit les deux mélangés sans noter de différences.

Nous avons étudié l'influence qualitative des lipides en utilisant trois matières grasses : l'huile de tournesol, la margarine (Astra) et le saindoux de porc.

Dans le cadre de l'étude d'une activité stéatosante deux paramètres sont influants en ce qui concerne les lipides : la saturation des acides gras et, pour les acides gras saturés, la plus ou moins grande longueur de leur chaîne hydrocarbonée. Voici résumé d'après la littérature la répartition des acides gras dans les trois types de lipides étudiés (Tableau IV, page 33).

Dans la plupart de nos essais, nous avons étudié la cinétique de la stéatose chez la souris mâle de 20-22 grammes. Pour toutes les expérimentations rapportées dans ce travail, nous avons vérifié au préalable l'état physique de nos animaux par une observation pondérale pendant une à deux semaines; les animaux qui ne paraissaient pas en pleine santé furent systématiquement éliminés. Ce tri est très important car les souris présentant un mauvais état général au début d'un essai peuvent complètement perturber les résultats.

TABLEAU IV

H. de TOURNESOL

IND. SAP. 180
IND. IODE 130

MARGARINE

IND. SAP. 220
IND. IODE 46

SAINDOUX

IND. SAP. 198
IND. IODE 60

0 20 40 60 %

< 10
12
14
16
18
20
22
24

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

0-16
18
20
22

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

18-2
18-3
20-4

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

0 20 40 60 %

Pourcentage des acides gras saturés et insaturés constituant l'huile de tournesol, la margarine (ASULA) et le saindoux (de porc)

Les régimes ont été placés dans des flacons tarés fixés horizontalement dans la cage (*). Ce procédé nous a permis d'éviter la souillure des aliments, de limiter au maximum les pertes et ainsi de vérifier la prise alimentaire journalière. Celle-ci est environ de 2 à 3 grammes par jour et par souris en ce qui concerne les régimes hyperlipidiques et hypoprotéiques. Il est nécessaire de suivre tout au long des essais la prise de nourriture ainsi que le poids des animaux. Les résultats obtenus ne peuvent être enregistrés que si les animaux témoins et traités ont consommé la même quantité de nourriture. Il est possible, en effet, que le produit testé, incorporé dans le régime, ait une action sur l'appétence des animaux objectivés par une modification notable de la prise alimentaire moyenne.

(*) Flacons type "histologie" de 80 mm de haut et 25 mm de diamètre.

I - 2

LES HEPATITES TOXIQUES

EXPERIMENTALES

I - 2 1 STEATOSE A L'ETHIONINE

Depuis de nombreuses années l'éthionine ou éthylhomocystéine est utilisée chez les anglo-saxons pour la production d'une stéatose hépatique chez le rat. Les premiers travaux importants remontent à 1950 (211), ils ont permis de relier l'activité stéatosante de l'éthionine à son pouvoir inhibiteur dans la synthèse protéique (82).

En même temps que son hépatotoxicité, l'action de l'éthionine a été étudiée sur d'autres organes et notamment au niveau du pancréas (83) (236) (4) (95).

Il y a une vingtaine d'années encore, on pensait généralement que la formation de "foie gras" était le résultat d'une déficience en choline et en groupements méthyls. Or, la choline s'avérait sans effet sur l'évolution d'une stéatose consécutive à l'administration d'éthionine tandis que la méthionine était d'une efficacité totale. Des études plus approfondies ont montré que les stéatoses, liées à une carence en choline ou éthionine, différaient sensiblement et par leur nature et par leur localisation (133).

La méthionine pouvait donc avoir une activité antistéatosante par un processus indépendant de la choline. Les travaux de SIDRANSKY le confirmèrent en montrant que la stéatose produite par un régime dépourvu entièrement de méthionine était absolument identique à celle induite par l'éthionine. Parmi les modalités d'action de l'éthionine nous citerons les inhibitions du transfert du groupement méthyl à la choline (210) et de la transformation en acide formique du méthyl de la méthionine.

Il est maintenant certain que l'éthionine agit sur la synthèse protéique en tant qu'anti-métabolite de la méthionine. Celle-ci est utilisée au cours de la synthèse protéique directe mais elle est aussi partiellement dégradée : l'atome de soufre se retrouve dans la

cystéine et le groupement méthyl entre en jeu dans des réactions de transméthylation. Toutes ces destinées sont inhibées chez des animaux traités à l'éthionine (209) (152).

Les effets de l'éthionine varient en fonction du sexe : les animaux mâles moins sensibles ne développent pas de stéatose aussi rapidement que les femelles, et cette différence a été retrouvée dans tous les cas quelle que soit la race des animaux utilisés ainsi que dans les stéatoses provoquées par des régimes carencés en méthionine. L'ovarectomie chez les femelles ou l'administration d'oestrogènes chez les mâles ne modifient pas la cinétique de la stéatose (84) (85); la castration est à l'origine, chez les mâles, d'une infiltration graisseuse tandis que les femelles sont protégées par un traitement aux androgènes et à l'hormone somatotrope (84).

Il a été montré aussi que l'administration d'éthionine inhibe totalement la synthèse protéique chez les femelles et non chez les mâles. Cette action sélective a été mise en évidence in vivo par incorporation d'acides aminés marqués dans le foie ou les protéines plasmatiques et in vitro par dosage de systèmes enzymatiques tels que la tryptophane peroxydase ou l'incorporation de leucine marquée (85).

Des travaux plus récents intéressant la microscopie électronique et l'ultra centrifugation ont permis de localiser les effets de l'éthionine sur certains composants cytoplasmiques bien définis. La relation - foie gras - inhibition de la synthèse protéique - pourrait n'être que fortuite, cependant les modifications dans la synthèse protéique précédant de quelques heures le début de la stéatose, il semble que ces deux manifestations soient liées.

Mais aucune preuve définitive n'a encore été apportée sur ce point malgré les nombreux travaux entrepris depuis une dizaine d'années pour tenter de le démontrer (91).

Il est intéressant de noter qu'en ce qui concerne les acides nucléiques, l'injection d'éthionine chez le rat (50 mg/kg I.P.) amène une diminution des teneurs du foie en guanine et uracile et une augmentation en pyridines méthylées (46). RABBI a observé de son côté chez

des rats soumis pendant six jours à un régime à l'éthionine une chute des taux hépatiques de la glucose-6-phosphatase et une élévation du glyco-colle, des acides glutamique, pyruvique et folique ainsi que du coenzyme A. (178)

Parmi les symptômes d'atteinte hépatique les troubles de la coagulation dus à l'éthionine ont été étudiés par CAVAZUTTI (52) (53) (54).

L'utilisation de l'éthionine marquée a montré que son incorporation dans les protéines de la fraction microsomiale du foie et du pancréas était supérieure chez les femelles tandis que l'incorporation de leucine C^{14} était identique dans les deux sexes. La castration des mâles ramène l'incorporation de l'éthionine marquée au niveau observé chez les femelles (161).

D'autres expériences ont montré que les ribosomes du foie de rats intoxiqués à l'éthionine incorporaient seulement 10 % de Leucine $2C^{14}$ par rapport aux ribosomes de foies normaux. L'ATP inhiberait complètement cet effet de même que l'inosine tandis que la guanine, l'uracile et la cytosine seraient sans effet (232) (233) Il y aurait un parallélisme entre la chute de l'A.T.P. hépatique et l'inhibition de l'incorporation in vitro de la leucine marquée. On pense que l'action de l'éthionine procéderait alors de la formation d'une S - Adenosyl - Ethionine qui remplacerait le nucléotide normal.

Cette chute d'A.T.P. après traitement à l'Ethionine a été retrouvée par SCHULL concomitante à une chute des phosphorylases qui ne serait qu'une conséquence de la première (208). Cet effet est plus prononcé chez les femelles que chez les mâles et l'A.T.P., l'adénine et la méthionine inhibent totalement cette diminution de l'activité enzymatique (61). HUTTERER et ses collaborateurs ont décelé chez des femelles traitées à l'éthionine (600 mg/kg en I.P.) de sévères atteintes mitochondriales dans le foie (120). D'après ces derniers auteurs les deux processus seraient indépendants l'un de l'autre.

Mais c'est surtout sur la stéatose même, engendrée par l'éthionine, que se sont penchés les biochimistes et de nombreuses études ont été menées sur la composition des graisses ainsi que sur les modifications biochimiques accompagnant toute perturbation d'un métabo-

lisme énergétique : A.T.P., nucléotides (121). Les travaux d'OLIVECRONA (168) ont montré que chez des rats à jeûn et ayant reçu une injection d'Ethionine (200 mg/kg I.P.), les glycérides sériques diminuaient tandis que les taux d'acides gras libres étaient augmentés. On observe une hypolipémie au cours des premières 24 heures et un retour à la normale après 72 heures. Parallèlement, les lipides hépatiques sont accrus, le taux maximal étant atteint en 24 heures. Sur le plan qualitatif il a été trouvé en outre des taux élevés des acides oléique et linoléique et diminués en acides stéarique et palmitique; mais si de l'acide palmitique marqué et lié à une albumine est injecté chez des rats préalablement traités à l'éthionine, celui-ci est capté et normalement estérifié par le foie (169).

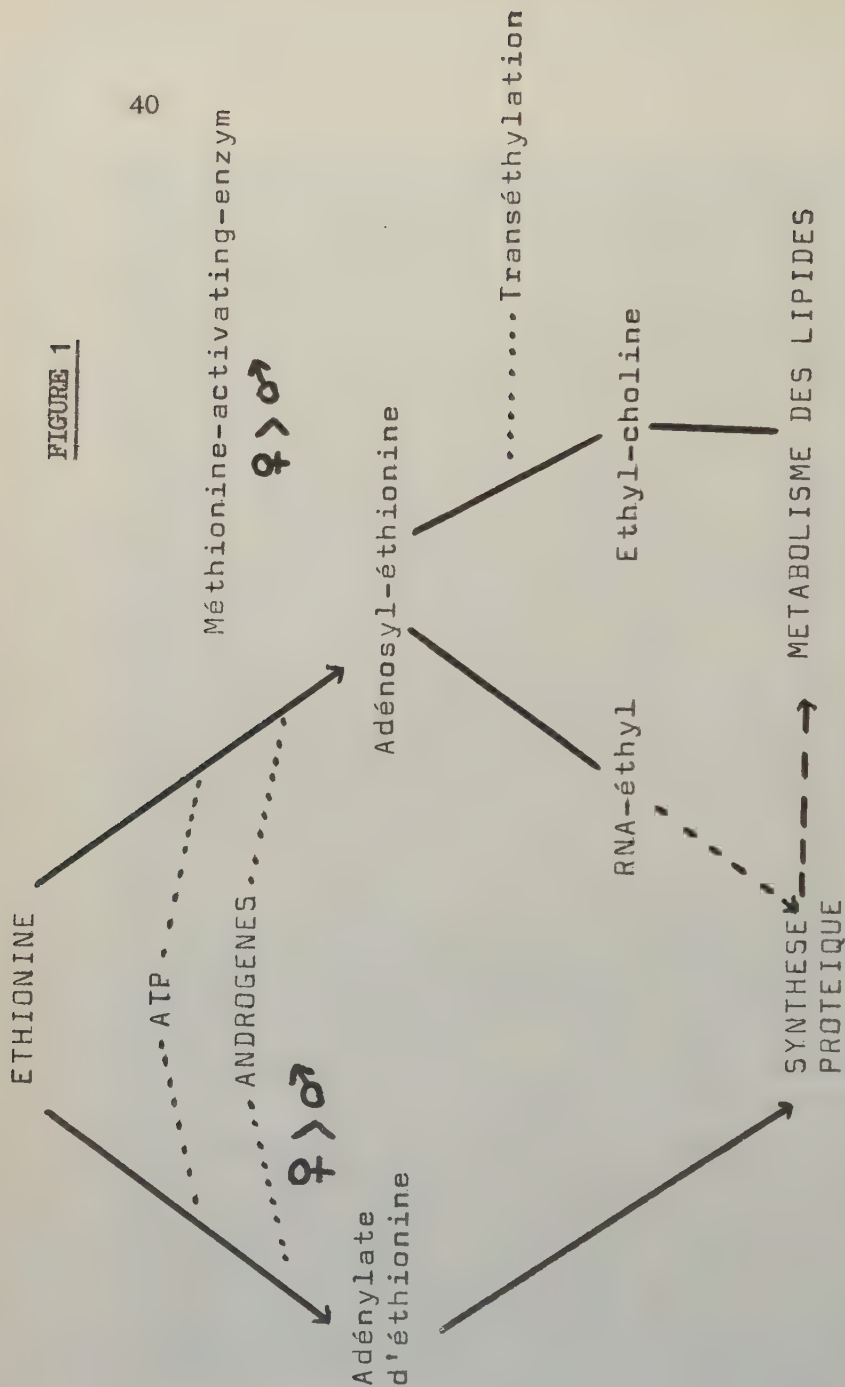
L'étude de l'évolution des lipides sériques chez des rats soumis à un régime à l'éthionine a donné des résultats intéressants. Ainsi SEIDEL (207) avec un régime prolongé à l'éthionine (0,25 %), contenant de l'acide oléique (0,5 %), du cholestérol (1 %) et 25 % d'huile de coprah, a vu décupler les triglycérides sériques. (*)

Cet effet est inhibé lorsqu'on incorpore au régime des quantités de méthionine égales à l'apport d'éthionine. Un tel régime est fortement hypercholestérolémiant : l'addition d'éthionine fait diminuer la cholestérolémie (de 20g à 10 g/l), et l'association éthionine + méthionine ramène les taux de cholestérol moyen à une valeur proche de la normale.

Après injection d'éthionine, dans les heures qui suivent, il a été noté une chute importante de l'A.T.P. A.D.P. et A.M.P. dans le foie. De même, l'éthionine administrée au régime de 0,25 % chez des rats a amené des modifications importantes quant aux nucléotides libres du foie (47) (179) et principalement A.T.P., U.T.P. et G.T.P. La synthèse du DPN dans le foie est très diminuée surtout chez les femelles et les chutes du D.P.N. et de l'A.T.P. vont de pair (214).

(N.B.) Ces résultats ne peuvent être admis sans réserve : opérant dans des conditions expérimentales voisines FEINBERG aboutit à des conclusions totalement opposées (90).

FIGURE 1



 MECANISMES D'ACTION DE L'ETHIONINE

 (d'après NATORI)

Nous avons utilisé l'éthionine en tant que toxique stéatosant du foie chez la souris adulte. Les voies empruntées ont été la voie intrapéritonéale et la voie orale. La faible solubilité de l'éthionine dans l'eau (environ 2,5 % dans de l'eau à 35°) amène à injecter des volumes importants. Les faibles résultats obtenus avec des injections soit uniques soit répétées nous ont conduit à administrer de préférence le toxique par voie orale incorporé dans le régime. Des essais préalables à la concentration de 1 % nous ont montré que celle-ci était trop forte, mais par contre à 0,1 % les animaux ne présentaient pas d'atteinte hépatique statistiquement exploitable après quinze jours de régime. Une étude systématique avec les concentrations de 0,2 - 0,3 - 0,4 et 0,6 % nous a permis de choisir la teneur de 0,3 ou 0,4% comme étant celle donnant les résultats les plus homogènes.

Les régimes ont été préparés à partir de provende en poudre additionnée de 60 % d'eau dans laquelle le toxique avait été préalablement dissous. Avec la pâte obtenue après mélange on a confectionné des croquettes en forme de tablettes de 150 grammes environ. Après dessiccation totale sous air chaud les "pains" étaient suspendus, après pesée, dans les cages. Ce procédé évite la souillure et la perte de la nourriture et permet ainsi aisément de vérifier la prise alimentaire.

En dehors de certains paramètres comme le poids et le sexe des animaux, il en existe un inhérent à l'animal. En effet nous avons noté que des souris mâles, garanties SWISS, de même poids mais de provenances différentes, soumises en même temps à un régime à 0,3 % d'éthionine dans des conditions expérimentales identiques, contractaient des stéatoses de gravités statistiquement très différentes. Ce phénomène du reste retrouvé à plusieurs reprises nous a amené à éliminer pour ce test les souris d'une des deux origines. Ceci explique la raison pour laquelle nous préconisons l'emploi d'un nombre égal de témoins d'intoxication et d'animaux traités.

I - 2 2 - HEPATITES AU TETRACHLORURE DE CARBONE

Le tétrachlorure de carbone est le toxique hépatique type par excellence. Il a été utilisé dès 1921 comme anthelmintique (108) mais son hépatotoxicité a été reconnue très rapidement par MEYER et PESSOA (153). Ces auteurs ont étudié les effets toxiques du tétrachlorure de carbone chez la plupart des animaux de laboratoire : en essai aigu, par voie orale ou sous cutanée, le solvant n'est toxique qu'à de très fortes doses (15-30 g./Kg), il serait même doué d'une innocuité totale chez la poule et le singe. Au niveau du foie cependant, même à des doses faibles, on observe, quelle que soit la voie d'introduction, une atteinte hépatique objectivée par une infiltration graisseuse avec nécrose centrolobulaire maximale après un à deux jours et retour à la normale après 4 à 7 jours. Les animaux ne présentent ni ic-tère, ni oedème, ni ascite (142).

Ces lésions anatomo-pathologiques sont connues depuis longtemps et ont été précisées par les études réalisées au microscope électronique (49). Chez le rat, l'administration de C Cl_4 provoque dans les quinze premières minutes l'occlusion des sinusoides, dans les deux heures apparaissent les "cellules ballons" dans la zone centrolobulaire tandis que les granulations de l'ergatoplasme s'estompent. Parallèlement on observe une disparition de la basophilie cytoplasmique et une diminution du taux des RNA. Vers la sixième heure, au niveau des "cellules ballons" centrolobulaire, se forme une zone de stéatose. A la douzième heure, les lésions sont manifestes au centre du lobule, la nécrose acidophile est nette et les noyaux sont souvent fragmentés; à ce stade les lésions mitochondriales sont nettement visibles au microscope électronique. A la quarante huitième heure, l'atteinte est maximale et à partir de la soixante douzième heure commence la régénération tissulaire qui se fait à partir de petites cellules très basophiles et à noyaux volumineux (167) (215) (63).

En dehors de cet aspect morphologique, des modifications intéressant le métabolisme cellulaire ont été mises en évidence par de nombreux auteurs à l'aide de techniques biochimiques et histochimiques (216)(230)(248).

Une heure après administration orale de tétrachlorure de carbone chez des rats, REYNOLDS note une altération du réticulum endoplasmique, de la membrane cellulaire, des mitochondries ainsi qu'une perte progressive de la glucose - 6 - phosphatase. Par contre, dans ce délai, la deshydrogénase succinique n'est pas encore touchée (186).

L'activité de l'ATPase et de la cytochrome oxydase a été étudiée par histochimie enzymatique sur des foies de rats intoxiqués par des injections de tétrachlorure de carbone répétées deux fois par semaine pendant cinq mois. La teneur des hépatocytes en ces deux enzymes a été trouvée très basse et le resta longtemps encore au cours des processus de régénération (15) (202).

Récemment, une étude histologique d'ATERMAN sur les lésions provoquées par le tétrachlorure de carbone injecté directement dans la veine porte chez le rat et la souris a fourni des résultats contradictoires. L'auteur a décelé une atteinte limitée aux zones périportales et la nécrose des cellules était souvent liée à une vasodilatation prononcée des sinusoides (8). En adoptant les mêmes conditions expérimentales POST (177) a montré que la régénération hépatique diminue avec l'âge. L'augmentation des acides nucléiques est bien supérieure chez le rat jeune que chez le rat vieux, et les modifications de la ploïdie sont plus fréquentes chez ce dernier.

DINNAN a étudié l'évolution de différents enzymes sériques et hépatiques chez des rats exposés à des vapeurs de tétrachlorure de carbone (0,5 %) pendant des temps plus ou moins prolongés (75). Les enzymes d'origine non mitochondriale augmentent beaucoup dans le sérum immédiatement après l'exposition (6 heures) et en l'absence de nécrose, ce fait peut être valablement interprété comme une altération primaire de la perméabilité de la membrane. Seule la glutamique deshydrogénase apparaît dans le sérum beaucoup plus tardivement ce qui s'explique quand on sait que cet enzyme est présente dans les mitochondries atteintes au stade de nécrose.

Chez la souris intoxiquée au tétrachlorure de carbone, les taux hépatiques de deshydrogénase succinique sont très élevés dès la deuxième heure de l'essai et durant 24 heures. Cette augmentation est parallèle à l'atteinte mitochondriale : il semble que le toxique stimule la formation ou la fragmentation des mitochondries de l'hépatocyte. De telles variations de la deshydrogénase succinique hépatique ont été retrouvées chez des rats intoxiqués chroniquement au tétrachlorure de carbone et partiellement hépatectomisés (16).

Pour REES la nécrose, la fuite des enzymes cellulaires et l'atteinte des mitochondries sont associées, mais la stéatose correspondrait à une manifestation différente de la toxicité hépatique. Cet auteur a noté aussi un passage tardif de la deshydrogénase glutamique des mitochondries dans le sang.

Chez des rats intoxiqués au tétrachlorure de carbone CAIRELLA a noté une augmentation de l'aldolase, de la fumarase et de l'ATPase sériques, dans le foie une augmentation de l'aconitase et de l'ATPase, ainsi qu'une chute de l'aldolase et de la fumarase.

TROPEANO a étudié l'évolution de l'arginase dans le sérum de cobayes intoxiqués à la dose de 1,5 à 2 ml/Kg par voie sous cutanée. Cet enzyme, qui n'est pas décelée dans le sang chez l'animal témoin, apparaît dès la première heure, est maximale à la douzième heure de l'essai et reste stable ainsi pendant six jours. Les auteurs utilisent ce test pour montrer le pouvoir légèrement hépatoprotecteur d'une association de vitamines (B₁₂, PP, C et acide folique). (224) (226).

D'après FRUNDER et BLUMER (100) la distribution de l'AMP, ADP et ATP dans les fractions cellulaires de foies est perturbée chez la souris intoxiquée au tétrachlorure de carbone : la concentration globale n'est pas changée mais les mitochondries contiennent deux fois plus d'ATP que les témoins et par contre la fraction soluble en contient deux fois moins.

GALLAGHER et REES (102) ont comparé les répartitions des nucléotides pyrimidiques présentes dans le tissu hépatique chez le rat intoxiqué au tétrachlorure de carbone, à la thioacétamide et à la diméthyl nitrosamine. Les modifications histologiques de l'hépatocyte et la biochimie des métabolites du cycle d'EMBDEN-

MEYERHOF dans le foie, le muscle et le plasma ont fait l'objet aussi d'une étude importante chez la souris intoxiquée au tétrachlorure de carbone (34).

Au point de vue lipidique, l'administration d'une seule dose de toxique à des rats normaux amène une augmentation significative des triglycérides hépatiques et une chute des glycérides plasmatiques. Les lipides sont affectés d'un coefficient 1,3 après intoxication. Cette augmentation est due à un accroissement des lipides ternaires (essentiellement des glycérides) dont le taux est multiplié par deux (180) tandis que la fraction phospholipidique est diminuée de moitié (118).

En ce qui concerne les acides gras, on a observé après intoxication, une augmentation des acides oléique et linoléique (2). Cependant KOBAYASHI dans des foies de rats intoxiqués chroniquement au tétrachlorure de carbone, a trouvé un accroissement des phospholipides et lipides totaux prévenu en partie par un régime contenant 1 % de méthionine (132).

Dans le sérum d'animaux intoxiqués on a noté une diminution des lipides et lipoprotéines (150) et une légère augmentation de l'acide linoléique; par contre les taux d'acides linoléique et arachidonique demeureraient constants (187). Quant aux protéines plasmatiques elles diminuent et leur composition relative se modifie -(66).

D'une manière générale, le tétrachlorure de carbone semble inhiber le transport des triglycérides hors du foie et ce processus pourrait être à l'origine de la stéatose. Chez le rat normal, la perfusion du foie isolé libère des triglycérides entraînés dans le perfusat; sur des foies de rats intoxiqués, prélevés trois heures après l'intoxication aucun triglycéride n'apparaît dans le liquide de perfusion (114). D'autre part, la synthèse de triglycérides à partir d'acétate marqué n'est pas augmentée par le tétrachlorure de carbone. On pense généralement qu'une étape essentielle de l'excrétion des triglycérides réside dans la synthèse de lipoprotéines dans le réticulum endoplasmique à partir de triglycérides synthétisés à un autre niveau cellulaire : l'intoxication par le tétrachlorure atteindrait le réticulum endoplasmique et par là la synthèse des lipoprotéines limitant ainsi l'excrétion des triglycérides formés.

Ces rappels tendent moins à expliquer le mécanisme de l'action toxique du tétrachlorure de carbone qu'à rendre compte de la complexité des modifications induites par cet agent hépatotoxique. Chacun des travaux que nous avons relevés dans la littérature ne porte en fait que sur un des facteurs internes et il est bien difficile à leur lumière de dégager une vue générale correcte du problème.

HASHIMOTO admet que l'uridine et la cytidine exercent une action hépatoprotectrice par le fait que ces nucléotides préviennent l'augmentation des hexosamines et du collagène hépatique provoquée par le tétrachlorure de carbone (112). Sur la base des seuls critères histologiques, FIUME attribue à l'aminocetonitrile un pouvoir hépatoprotecteur dans l'intoxication au tétrachlorure (96). Selon MILCOU et VAISLER le méthylthiouracile serait un antidote de ce toxique (154) et il en serait de même de l'acide ascorbique dont l'administration massive freine l'hypertransaminasémie secondaire à l'intoxication (217) (125).

Dans le cadre de notre travail nous avons choisi, pour évaluer une atteinte au tétrachlorure de carbone de doser certains enzymes sériques dont l'augmentation représente soit une modification de la perméabilité cellulaire soit un syndrome de cytolyse; nous avons en outre pratiqué le test d'épuration sanguine de la BSP dont les perturbations rendent compte d'une atteinte globale de la masse fonctionnelle du foie.

Nous avons utilisé deux voies d'introduction : la voie sous-cutanée et la voie respiratoire, cette dernière étant envisagée notamment dans le but de réaliser des intoxications chroniques. Nous avons tenté de normaliser cet essai en utilisant une enceinte (bac parallélipipédique) de 400 litres rendu hermétique par une nappe en plastique la recouvrant et bien assujettie sur les parois (Figure 2, page 47). A l'intérieur, nous avons placé un petit ventilateur et devant l'hélice un support maintenant à l'horizontale une feuille de papier filtre. La cage contenant les animaux est placée à l'autre ex-

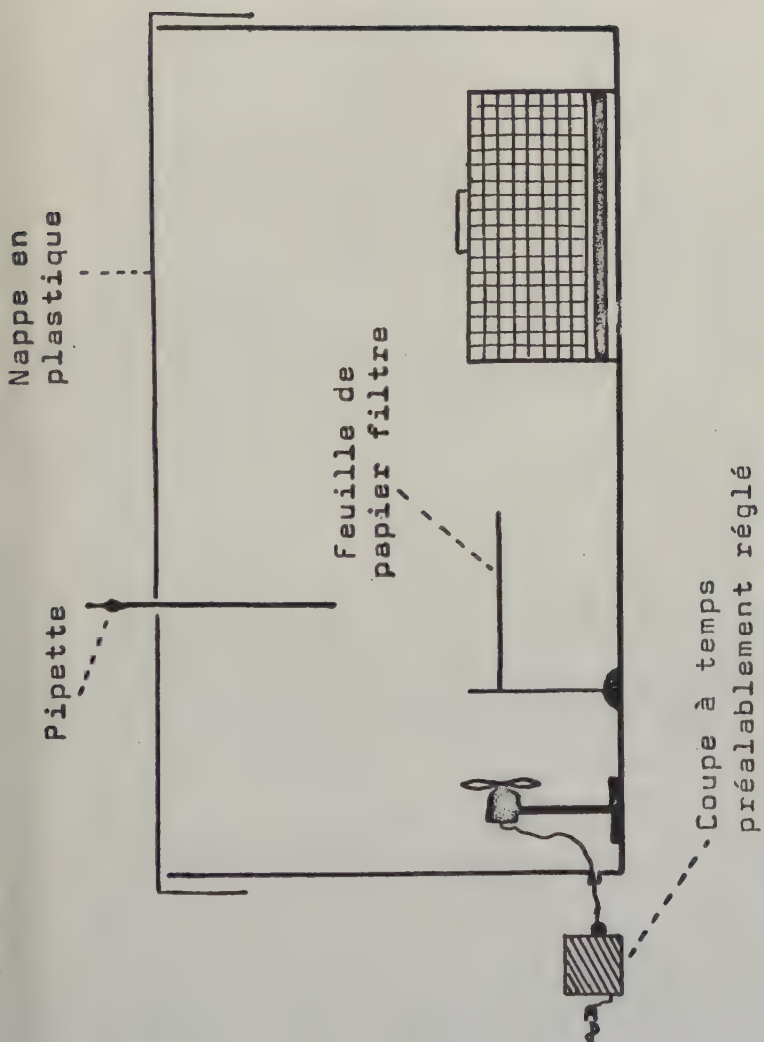


FIGURE 2 - Dispositif utilisé pour les intoxications au CCl_4 par inhalation

trémité du bac. Le ventilateur est relié à un coupe à temps réglable assurant sa mise en marche quelques minutes toutes les heures.

Par un orifice pratiqué dans la nappe en plastique, juste au-dessus de la feuille de papier filtre, on fait tomber un certain volume de tétrachlorure de carbone mesuré à l'aide d'une pipette graduée précise. Le brassage de l'air régulièrement entretenu par la suite assure une vaporisation quasi immédiate du tétrachlorure et sa dispersion homogène dans l'air ambiant. En tenant compte du poids moléculaire ($M = 154$) et de la densité du tétrachlorure ($D = 1,594$) on détermine facilement la quantité de solvant nécessaire pour obtenir la concentration toxique désirée.

A pression normale et à 25°C , 154 grammes de tétrachlorure de carbone (soit environ 97 ml) donnent 25 litres de vapeur. Si l'enceinte a un volume de 400 litres, il faudra en utiliser $\frac{97 \times 0,4}{25} = 1,55$ ml environ pour avoir une concentration de 0,1 p. 100 (0,4 litres).

Au prime abord, la voie pulmonaire semble peu précise; aussi avons-nous intoxiqué des rats et des souris pendant 15 heures mais avec des concentrations croissantes. Les résultats obtenus permettent de penser que cette voie est suffisamment sensible, précise et fidèle. Suivant le nombre d'animaux et la durée d'intoxication il faudra choisir une enceinte de plus ou moins grande taille pour que la raréfaction en oxygène n'ait aucune influence.

I - 2 3 THIOACETAMIDE ET NECROSE HEPATIQUE

L'hépatotoxicité de la thioacétamide et la possibilité d'induire ainsi des tumeurs hépatiques ont été découvertes il y a une vingtaine d'années (FITZBURGH et NELSON) (94). Mais il faut attendre 1956 pour trouver les premiers travaux histologiques et biochimiques importants ayant trait à ce toxique (106) (101).

Chez les rats intoxiqués de façon chronique on a pu constater l'apparition successive d'une cirrhose et enfin, après plusieurs mois d'intoxication d'un cancer. (43) (205).

Cette symptomatologie n'est pas sans rappeler celle qui est observée en général en clinique. Depuis, les travaux se sont multipliés pour déceler toutes les modifications biochimiques qui accompagnent une intoxication soit aiguë, soit chronique à la thiocétamide (182). Ces recherches portent notamment sur les modifications et la répartition du RNA nucléolaire.

Tout d'abord les examens histologiques pratiqués chez des rats ayant reçu 200 mg/Kg de thioacétamide par voie sous-cutanée ont révélé que l'intoxication débutait assez précocement (220). A la 3ème heure de l'essai, il y a déjà un début de dilatation des sinusoides. Après 6 heures on note une fuite du glycogène et la disparition de la basophilie cytoplasmique. A la 9ème heure, la plupart des cellules centrolobulaires sont vacuolées et contiennent quelques lipides, les veines centrales et les sinusoides adjacents sont dilatés et des canaux d'oedème apparaissent reliant les veines entre elles. A partir de la 12ème heure on observe un tableau typique de nécrose centrolobulaire qui va croître jusqu'à la 30ème heure. Dès ce moment, les cellules nécrosées sont remplacées peu à peu par des cellules mononuclées; les cellules périportales entrent en mitose les premières. La régénération de la zone intermédiaire ne commence qu'après 48 heures. Elle s'étend rapidement à partir de la zone périportale et se trouve très avancée au cinquième jour. Après une semaine, aucune structure histo-

logique anormale n'apparaît et le foie peut être considéré comme définitivement guéri.

Les canaux d'oedème qui se forment au début de l'intoxication sont la conséquence de troubles importants de la perméabilité de la membrane responsable de la pénétration d'ions Ca^{++} dans la cellule; ce processus déterminerait une atteinte des mitochondries et provoquerait la nécrose (128). Au cours d'une intoxication aiguë, en dehors de ces dépôts cellulaires de calcium près des mitochondries, on note, dès les premières heures, une diminution de l'ergatoplasme qui semble complètement se dissoudre et un étalement du réticulum endoplasmique qui paraît s'étaler en prenant des formes spiralées; parallèlement on note une baisse significative du glycogène.

Au point de vue enzymatique, il est à noter que les phosphatases alcalines cellulaires restent stables après une injection de thioacétamide tandis que les phosphatases acides s'élèvent dès la 5ème heure; l'activité des mitochondries (mesurée par la DPN diaphorase et la deshydrogénase succinique) est légèrement diminuée (234). De toute façon, il est à noter que ce tableau d'intoxication n'est pas spécifique de la thioacétamide, en particulier la perte de la basophilie cytoplasmique, les canaux d'oedème, la nécrose centrolobulaire et la restauration rapide de l'hépatocyte se retrouvent après des intoxications aiguës à l'éthionine, au tétrachlorure de carbone et à d'autres toxiques; de même, sur le plan biochimique, l'augmentation du calcium hépatique, de nombreux enzymes sériques, et les modifications des protéines tissulaires sont identiques chez les animaux intoxiqués au tétrachlorure de carbone ou à la thioacétamide (234).

Par contre, la thioacétamide conduit à une nécrose hépatique sans accumulation de graisse et n'a aucun effet sur le cycle triglycérique; il s'oppose ainsi au tétrachlorure de carbone qui inhibe la synthèse protéique et la sécrétion par le foie des triglycérides et lipoprotéines constituées à partir des acides gras non estérifiés transportés par le sang (181).

La thioacétamide donne des résultats plus intéressants encore, lorsqu'elle est administrée de façon chro-

nique à de faibles concentrations (0,03 à 0,01 %) dans l'eau de boisson des animaux; elle détermine chez ceux-ci une évolution symptomatique identique à celle de la cirrhose humaine. SCHWIETZER, en donnant 35 mg de thioacétamide par jour à des rats, obtient une cirrhose en 1 mois et des adénomes après 7 mois (205). Avec des rats soumis à un régime contenant 0,032 % de thioacétamide (ce qui correspond à 8-10 mg/jour/rat) HARTMANN obtient une fibrose en 4-5 mois et une cirrhose en 11 mois (111).

Au cours de cette intoxication, on note une chute de l'ARN et du glycogène centrolobulaire et, dans les autres cellules, une augmentation de volume du noyau et du nucléole, lequel s'enrichit en ADN (196). Cette hypertrophie nucléaire et nucléolaire, avec épaississement de la membrane cytoplasmique, multiplication de l'appareil de Golgi et lésions des mitochondries, a été retrouvée par SALOMON en microscopie électronique (197). Cet auteur pense que l'augmentation de l'ARN nucléolaire est due à un accroissement de la synthèse du RNA et un blocage de son passage vers le cytoplasme. Les noyaux des hépatocytes chez les animaux intoxiqués (50 mg/Kg/jour pendant 9 jours) n'incorporent plus l'acide orotique - 2 C^{14} (1); ADAMS y distingue deux ARN répondant différemment à l'intoxication quant à leur marquage respectif par l'acide orotique.

D'autre part, chez des animaux intoxiqués à la thioacétamide ingérée dans l'eau de boisson (0,02 %), il a été trouvé après 16 semaines, des teneurs hépatiques en hydroxyproline, glucosamine, galactosamine et mucopolysaccharides, qui atteignent environ le double de leur valeur normale (5).

Ces données justifient l'emploi de la thioacétamide dans les hépatites expérimentales. Jusqu'ici, à notre connaissance du moins, seuls les chercheurs anglo-saxons se sont intéressés aux intoxications à la thioacétamide et à son inhibition pour étudier le pouvoir hépatoprotecteur éventuel de médicaments nouveaux (164) (98) (131).

Nous avons, chez la souris, cherché à évaluer l'atteinte hépatique consécutive à une intoxication à la thioacétamide. Pour cela nous avons créé une atteinte aiguë et réversible par injection unique sous-cutanée d'une dose de thioacétamide que nous avons fixée à 250 mg/Kg. D'autre part nous avons étudié l'évolution de l'hépatite lorsque le toxique est administré par voie orale dans le régime; les concentrations alors choisies ont été de 0,1 et 0,05 %.

I - 2 4 STEATOSE AU PHOSPHORE

Le pouvoir hépatotoxique du phosphore est connu depuis très longtemps et il n'est pas de manuel de toxicologie qui n'en parle. Toutefois nous n'avons trouvé dans la littérature qu'un très petit nombre d'études sur l'emploi possible de ce toxique dans les hépatites expérimentales (69) (25).

Au cours de l'atteinte aiguë au phosphore, on voit se développer une nécrose du parenchyme hépatique accompagnée d'une stéatose massive. Chez des rats ayant reçu par voie intrapéritonéale 1 ml/Kg d'huile phosphorée à 0,5 % une étude histologique a permis de mettre en évidence les faits suivants (123) :

- Dès les premières heures qui suivent l'injection du toxique, la stéatose hépatique apparaît à la périphérie du lobule en convergeant vers le centre, et celle-ci est généralisée après 36 heures.

- En 4 jours la stéatose atteint sa valeur maximale et le parenchyme, clair, présente alors une structure en mosaïque et non plus en travées.

- La régression de la stéatose se fait en sens inverse de son apparition, la région centrolobulaire étant la dernière envahie et la première reconstituée.

Sur le plan intracellulaire, les mitochondries sont en général peu atteintes, mais l'ergatoplasme disparaît rapidement.

Nous avons créé une telle stéatose chez la souris et chez le rat par injection unique d'huile phosphorée, l'atteinte hépatique étant évaluée par l'augmentation des taux tissulaires de lipides et de plus, chez le rat à l'aide du test d'épuration sanguine de la bromosulfoné-phtaléine.

I - 2 5 HEPATITES AU CHLOROFORME

Bien que n'ayant pas utilisé ce solvant chloré nous croyons devoir citer les hépatites au chloroforme car ce toxique est le plus anciennement connu et étudié.
(241)

L'hépatotoxicité des vapeurs de chloroforme a été depuis longtemps comparée à celle d'autres solvants volatils (139) (140) (69) (229).

Chez le rat soumis à une telle intoxication pour une concentration et une durée suffisante, le "foie gras" de nature glycéridique, est obtenu encore plus régulièrement qu'avec le tétrachlorure de carbone et principalement chez les femelles. La surcharge lipidique apparaît à la douzième heure avec une disparition du glycogène et de l'ARN. Dès le second jour de l'essai apparaît une hypertrophie centrolobulaire, puis une nécrose s'installe et s'étend rapidement. Au quatrième jour commence la régénération qui est presque totale au bout d'une semaine.

Bien que, comparant les nécroses obtenues chez des rats soumis à un régime hypoprotéique, puis à des vapeurs soit de chloroforme soit de tétrachlorure de carbone, NAKAMURA (160) ait trouvé une toxicité moindre de ce dernier, nous avons préféré utiliser le tétrachlorure de carbone.

Du reste, d'après les données de la littérature, le chloroforme n'est que très peu utilisé en pharmacologie et les travaux qui s'y rapportent, déjà anciens pour la plupart, ont trait essentiellement à la toxicologie de l'anesthésique.

I - 2 HEPATITE AU BROMOBENZENE

Le bromobenzène est un toxique parfois utilisé pour créer des hépatites chez l'animal. Son emploi est cependant peu fréquent et la littérature ne nous offre qu'un éventail restreint de travaux s'y rapportant (242) (68).

Nous avons pour notre part étudié les conséquences qu'avait, chez la souris, une administration de bromobenzène soit par voie sous cutanée soit par inhalation en suivant la technique utilisée pour le tétrachlorure de carbone.

Les résultats obtenus, compte tenu des doses administrées et de la sensibilité des tests choisis, ont montré que le bromobenzène dans nos conditions expérimentales ne possédait pas une hépatotoxicité suffisamment spécifique.

I - 2 7 HEPATITE A L'ALCOOL ETHYLIQUE

L'alcool éthylique est considéré en clinique comme l'agent causal le plus courant des atteintes hépatiques; mais il s'agit toujours d'une intoxication chronique, parfois à très long terme.

Il était donc difficile a priori de retenir l'alcool parmi les toxiques susceptibles d'engendrer une hépatite aiguë expérimentale. Au reste, les avis sont encore très partagés sur la toxicité chronique de l'alcool éthylique chez l'animal. A notre connaissance, la plupart des pharmacologues, ASHWORTH excepté (7), n'ont pu mettre en évidence une atteinte directe de l'hépatocyte, mais seulement son action synergique avec d'autres toxiques. Il a été trouvé notamment que l'alcool éthylique :

- augmente les lésions provoquées par les régimes carencés (147);
- aggrave les atteintes causées par une intoxication au tétrachlorure de carbone (141);
- favorise la nécrose chez la souris soumise à une intoxication au chloroforme (138) ou chez le rat soumis à une intoxication chronique à l'alcool allylique (130).

De toute façon, les perturbations biochimiques ou histologiques enregistrées après administration d'alcool, l'ont été avec des doses trop fortes (5 g/Kg) et trop rapidement pour être comparées éventuellement avec celles décelées dans le cas de l'alcoolisme (93).

Nous avons tenté de préciser les effets, chez des rats femelles, d'un régime alcoolique administré pendant dix-neuf mois. La teneur en alcool de l'eau de boisson de 8 % au début, a été régulièrement augmentée par la suite pour atteindre 25 % au cinquième mois.

CHAPITRE II

EVALUATION

DE

L'ATTEINTE CELLULAIRE

II - 1

DOSAGE DES
LIPIDES HEPATIQUES

L'apparition du "foie gras", nous l'avons vu précédemment, est le témoin d'un certain état pathologique du parenchyme hépatique. A cet état est donné le nom de stéatose; celle-ci a de multiples étiologies possibles et peut présenter des aspects non moins multiples (infiltration, surcharge, dégénérescence graisseuse.....). Cependant le point commun à tous les types de stéatose est une augmentation très nette du taux des lipides hépatiques, taux du reste assez constant chez les sujets normaux.

Aussi depuis longtemps s'est-on appliqué à doser les lipides hépatiques par diverses techniques d'extraction. Puis avec les progrès de la chimie analytique les graisses extraites ont été rigoureusement analysées (194). Cependant, l'étude qualitative des lipides sortant du cadre de ce travail, nous nous sommes penchés sur le seul problème quantitatif.

Nous avons extrait au soxhlet les lipides de broyats hépatiques triturés avec trois fois leurs poids de sulfate de soude anhydre. Puis nous avons comparé les résultats obtenus après une heure d'extraction avec deux solvants : chloroforme - méthanol (2-1) et méthylal-méthanol (4-1). Ces extractions répétées sur un échantillon moyen homogénéisé nous donnèrent des résultats légèrement inférieurs mais plus constants avec le mélange de Delsal. Cette technique d'extraction nous a paru cependant trop complexe pour des essais en grande série.

Nous avons alors adapté au dosage des lipides hépatiques la technique préconisée par DELSAL pour déterminer les lipémies, le mélange extractif étant constitué de méthylal-méthanol (4-1) (73). Le stade le plus important est celui de l'homogénéisation : les prises d'essai de 1 à 2 grammes environ sont broyées 15 à 20 secondes au broyeur ULTRA-TURRAX (on arrête l'opération quand la pulpe passe du brun-rouge à beige clair).

TECHNIQUE D'EXTRACTION

Introduire dans un tube à centrifuger 0,5 à 1,5 gramme de pulpe et 5 à 10 ml du solvant. Bien mélanger

à l'aide d'un agitateur formé d'un fil d'acier retourné plusieurs fois sur lui-même et que l'on fait tourner rapidement entre le pouce et l'index. Ce procédé a pour but d'émulsionner le broyat et de favoriser ainsi l'extraction, ce qu'on obtient difficilement avec un agitateur en verre.

Après trente secondes d'agitation, centrifuger le tube 5 minutes à 2.500 tours, puis décanté dans un cristallisateur et recommencer deux fois l'extraction avec 5-10 ml de solvant, en prenant toujours autant de soin à l'extraction. Décantées, les trois solutions extractives sont introduites dans le même cristallisateur et mises à évaporer une nuit à 30-40°.

L'extract brut obtenu est repris alors par 15 ml de méthylal pur préalablement porté à 30-35°. Recueillir la solution, après filtration, dans un cristallisateur taré. Evaporer à 30°-40° et peser le résidu.

Cette technique est celle que nous avons employée pour tous les résultats de notre travail; elle a l'avantage, avec une certaine habitude, d'être assez rapide, et les quantités de lipides extraits, de l'ordre de 40 à 100 mg permettent de limiter les erreurs pondérales.

A la suite de publications donnant pour des rats des teneurs de lipides hépatiques bien supérieures aux nôtres (58), nous avons comparé la technique que nous venons de décrire à celle, classique, de KUMAGAWA : coagulation des protéines par l'alcool bouillant pendant dix minutes, puis extraction au Kumagawa par l'éthanol (8 heures) et le benzène. Nous avons de fait trouvé pour un même broyat des chiffres supérieurs d'environ 30 % dus probablement aux substances "lipoidiques" extraites par ce mode opératoire et non par le mélange de DELSAL.

Une technique très simple de mesure d'un "indice lipidique" utilisant une réaction déjà connue (56) mais normalisée dernièrement par DREVON et SCHMIT (76) vient d'être adoptée avec le concours de SCHMIT au dosage des lipides tissulaires. La coloration rose obtenue en mettant en jeu la réaction sulfo-phospho-vanillique préconisée par les auteurs, est en effet proportionnelle aux

taux des lipides présents dans le milieu. Nous ne discuterons pas ici l'interprétation et la validité de cette réaction sur le plan biochimique, ces problèmes ayant été longuement étudiés récemment (203). Cependant nous pensons que cette technique s'applique tout particulièrement dans le cadre d'essais pharmacologiques notamment les dosages de lipides hépatiques.

TECHNIQUE DE DOSAGE

— Réactifs :

1. acide sulfurique pur ($d = 1,84$)
2. acide phosphorique pur ($d = 1,71$)
3. solution aqueuse de vanilline à 0,6 %

— Dosage :

Broyer le foie (ou la parcelle de foie) avec cinq fois son poids d'eau distillée (dilution au 1/6) et placer 0,2 ml de la suspension dans un tube à essai. Ajouter 4,8 ml de SO_4H_2 ($d = 1,84$). Agiter et porter au bain-marie bouillant pendant 10 minutes exactement et refroidir. Dans un second tube à essai, placer 0,2 ml de la solution acide, refroidie, et ajouter 3,8 ml de PO_4H_3 ($d = 1,71$) et 1 ml de la solution aqueuse de vanilline. Placer 15 minutes au bain-marie à 37° et photométrer la solution à 520 $m\mu$ en faisant le zéro sur un témoin constitué par les trois réactifs mélangés dans les proportions indiquées.

Cette technique est sensible puisque la prise d'essai ne dépend pratiquement que des dimensions du broyeur et elle permet de doser les lipides sur le foie d'une souris. D'autre part, elle autorise un grand nombre de dosages simultanés.

Nous avons mesuré la corrélation qu'il y avait entre l'intensité de la réaction colorée de divers homogénats hépatiques et la quantité de lipides extraits par la méthode de DELSAL.

Les résultats obtenus sur 50 essais chez des souris normales et présentant des stéatoses de gravités diverses sont les suivants :

TABLEAU V

LIP. HEP. en %	R.S.P.V. en div. Meunier	LIP. HEP. en %	R.S.P.V. en div. Meunier
3,85	46	6,60	118
3,00	55	6,30	115
4,30	56	7,05	130
4,00	58	7,00	120
3,20	65	7,30	125
3,20	68	7,30	136
4,12	70	7,90	122
4,70	73	7,70	142
4,50	74	8,55	136
4,45	76	8,60	158
4,00	77	8,50	164
3,50	80	8,50	146
4,00	83	9,00	153
4,70	83	9,25	160
4,50	84	9,30	170
4,60	87	9,50	166
4,50	89	9,70	163
4,20	89	9,80	173
4,90	90	10,00	167
5,60	91	10,10	180
5,00	96	10,80	183
5,20	99	11,00	180
5,70	105	11,10	186
6,65	118	11,50	187
6,70	120	12,70	192

Corrélation entre les résultats de lipides hépatiques obtenus par extraction et par la réaction sulfo-phospho-vanillique.

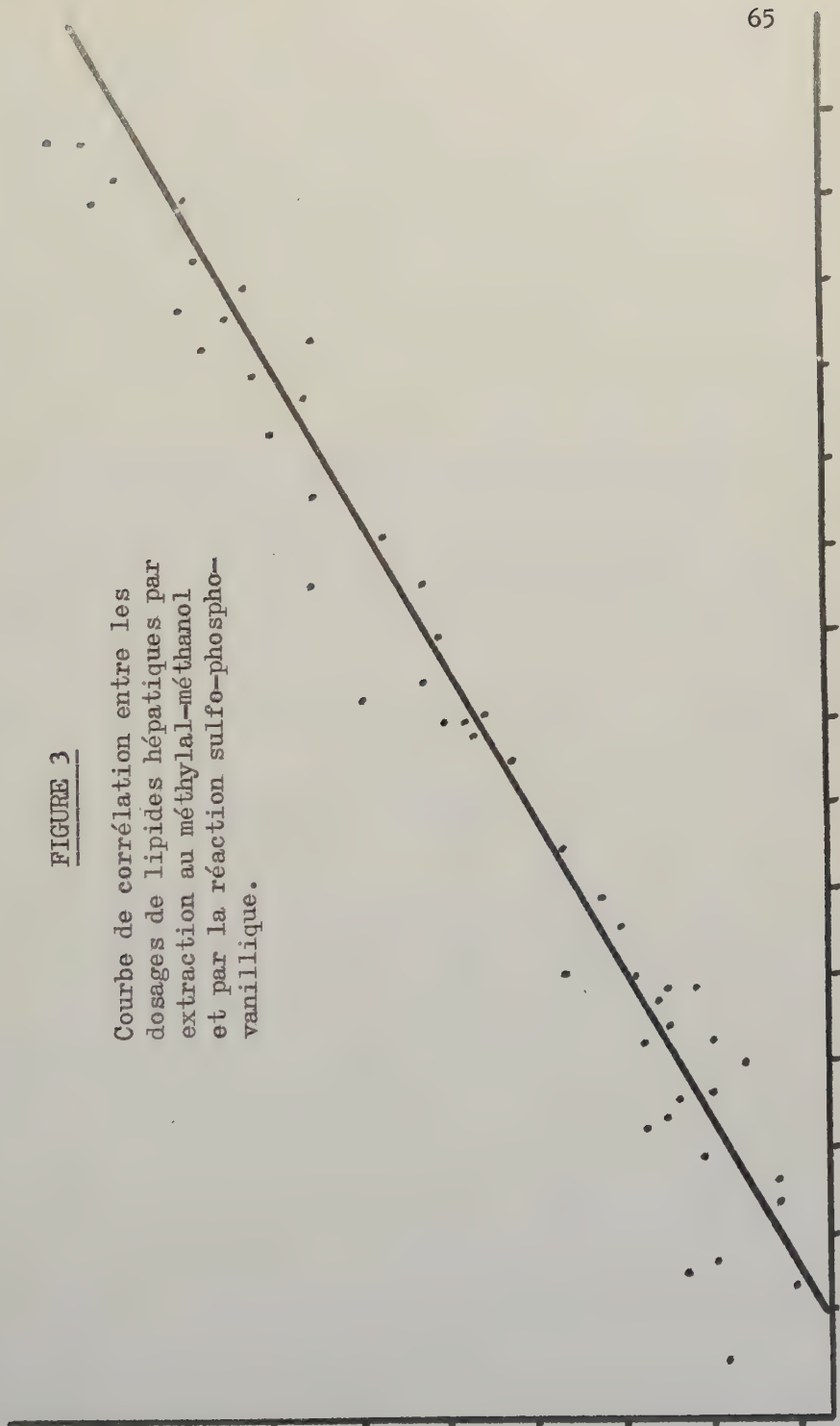
Le calcul statistique a donné une corrélation de 0,97.

On voit ainsi que la corrélation est excellente et compte tenu du fait que dans nos expérimentations nous utilisons toujours des animaux témoins, nous pensons que le gain de temps obtenu compense largement le doute qui plane sur la signification biochimique de cette réaction.

Cependant, cette réaction colorée n'ayant été mise au point que bien après le début de nos travaux, nous avons continué d'employer la technique d'extraction par le mélange de DELSAL.

FIGURE 3

Courbe de corrélation entre les dosages de lipides hépatiques par extraction au méthylal-méthanol et par la réaction sulfo-phosphovanillique.



II - 2

DOSAGE DES

ENZYMES SERIQUES

Dans un article très récent FAUVERT et BOIVIN font le tour de ce problème très complexe qu'est l'enzymologie clinique et l'enzymologie hépatique en particulier (89). Le manque de recul et le nombre sans cesse croissant des enzymes cellulaires dont la détermination semble présenter un intérêt pour juger d'une atteinte hépatique, ne font que compliquer la question.

"Si l'on considère la nature intime de l'activité métabolique qui s'exerce au niveau du parenchyme hépatique, on constate qu'elle est caractérisée par une instabilité extrême des réactions, à laquelle une organisation enzymatique vraiment immense et admirable assure l'ordre et la conclusion normale de ces phénomènes." (89) Cet équilibre enzymatique est la base fondamentale et régulatrice des fonctions hépatiques.

VILLA distingue dans le foie trois systèmes enzymatiques (231) :

1. Les systèmes enzymatiques essentiels ou primaires qui garantissent en toute phase d'activité un niveau énergétique maximal.
2. Les systèmes enzymatiques subordonnés ou secondaires, qui rendent compte des fonctions différenciées, caractéristiques de chaque tissu et qui, dans le foie, sont de la plus grande complexité.
3. Les systèmes enzymatiques accessoirs ou facultatifs.

Sans doute, la détermination des enzymémies et des teneurs du sérum en de nombreuses substances d'intérêt biologique, la recherche des tests de conjugaison d'élimination, d'utilisation ou d'oxydation de métabolites etc... sont importantes et utiles. Mais les données qu'on en tire constituent des expressions indirectes d'une situation fonctionnelle soutenue en premier lieu par le système fournisseur d'énergie, et malgré leur valeur, ces essais ne reflètent pas tous les aspects les plus délicats et les plus profonds du problème.

TABLEAU VI

ORDONNANCE BIOCHIMIQUE ET MORPHOLOGIQUE
DE LA CELLULE HEPATIQUE

d'après RICHTERICH (189)

STRUCTURE	SYSTEMES BIOCATALYTIQUES	FONCTIONS	ENZYMES
NOYAU	Gènes (ADN)	Hérédité	?
RETICULUM ENDOPLASMIQUE	- grains de Palade (ARN) - Perméabilité	Synthèse des protéines Résorption, sécrétion	Activation des ac.aminés Glucose-6- phosphatase
CYTOPLASME	- glycolyse - métabolisme intermé- diaire	Production d'énergie Acides aminés Hydrates de C.	Aldolase Lactico deshydr. P.hexose isomé- rase Transaminases Sorbitol deshyd.
MITOCHONDRIES	- Respiration cellulaire - Métabolisme intermédiaire	Production d'énergie Acides aminés Hydrates de carbone	Cytochromes Déshydrase glutamique Déshydrase alcoolique
LYSOSÔMES		Autolyse	Phosphatase Sulfatase Glucuronidase ac.
CANALICULES BILIAIRES		Élimination	Phosphatase alc. Ceruleoplasmine Leucine-amino- peptidase

Deux orientations prédominent dans ces études enzymatiques.

L'une consiste à observer le comportement des enzymes sériques en rapport direct avec les phases essentielles du métabolisme hépatique. Leurs variations doivent être interprétées avec prudence : la nature exacte des phénomènes qui provoque leur apparition ou leur augmentation dans le sang circulant est très incertaine.

La deuxième orientation de recherche fonctionnelle sur le foie malade, plus directe, est représentée par ce qui pourrait s'exprimer sous le terme d'"enzymobiopsie". Cette technique, possible à l'heure actuelle, n'a pas encore acquis droit de cité car, dans la plupart des syndromes les variations des différents enzymes sont nettement plus importantes dans le sérum que dans l'organe lui-même. Ce phénomène, apparemment paradoxal s'explique aisément quand on compare les taux respectifs des enzymes cellulaires et sériques. Ainsi, par exemple, dans le cas de la lacticodéhydrogénase nous avons retrouvé respectivement 3.500 u./ml dans le sérum et dans le foie 250.000 u./gr d'organe frais. Le rapport étant, dans ce cas de 1 à 80 il est évident que, lors d'une lésion hépatocellulaire une élévation de la L.D.H.sérique est plus marquée qu'une diminution de la L.D.H.cellulaire.

Lors d'une atteinte hépatique, les enzymémies peuvent soit diminuer soit augmenter. Une baisse de l'activité s'observe rarement et représente une diminution de la synthèse hépatique coïncidant avec un tableau clinique d'insuffisance cellulaire. Mais, en général, la plupart des activités enzymatiques étudiées augmentent dans les atteintes hépatiques et trois mécanismes possibles peuvent en être la cause : le reflux par stase biliaire, l'hyperproduction, la cytolysé (89). Certains enzymes, comme la phosphatase alcaline ou la leucine amino peptidase sont éliminés par la bile (42). Un obstacle à l'écoulement biliaire aboutit au reflux de ces enzymes vers le plasma.

Dans les deux cas, qu'il s'agisse de reflux ou d'hypersécrétion enzymatique, une activité sérique élevée va de pair avec une hyperactivité hépatique.

Du fait de la grande richesse des hépatocytes en enzymes, toute lésion hépatocellulaire va avoir pour

conséquence une libération d'une grande quantité d'enzymes dans le sang circulant.

Dans le tableau emprunté à FAUVERT sont notées les principales perturbations enzymatiques rencontrées ainsi que leurs causes. (Tableau VII, page 72).

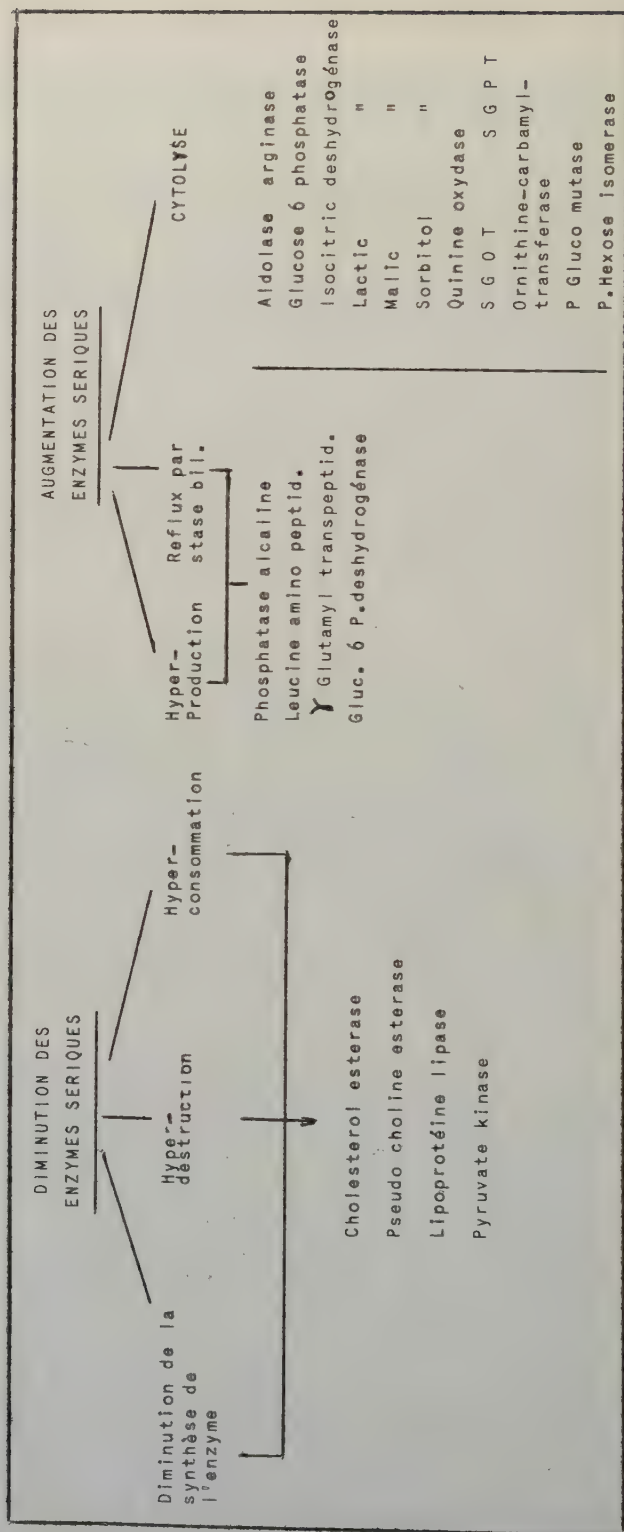
Comme nous l'avons dit plus haut, le terme de cytolyse doit être pris dans un sens très large car il correspond à un tableau incluant aussi bien les premières lésions biochimiques prémorphologiques que des altérations morphologiques bien assises dont la conséquence est vraisemblablement l'apparition de troubles de la perméabilité des membranes cellulaires et des organites intracellulaires (189). L'hyperenzymémie dépend à la fois de l'étendue des lésions, de leur vitesse d'installation et de la durée de vie plasmatique des enzymes (9).

Les plus étudiés sont les enzymes de la dernière colonne du tableau, dont l'augmentation de l'activité sérique constitue une part de ce que FAUVERT a appelé le syndrome de cytolyse (89). Rappelons seulement que les phénomènes initiaux prémorphologiques en sont des lésions biochimiques encore mal connues et probablement variables selon l'agent responsable de leur production; mais dans tous les cas la conséquence en est un trouble de la perméabilité des membranes cellulaires qui rend compte de la fuite plasmatique des enzymes contenus dans le cytoplasme de l'hépatocyte et dans les organites intracellulaires.

L'élévation du taux sérique des enzymes de la dernière colonne du tableau est donc essentiellement le témoin d'une lésion cellulaire qui peut rester au stade d'anomalie biochimique pure aboutissant éventuellement, suivant le toxique et le processus d'intoxication suivi à la nécrose de l'hépatocyte ou à sa restauration. Les hépatites expérimentales au CCl_4 par exemple s'accompagnent d'une élévation des enzymes sériques de ce groupe, élévation précoce, intense, proportionnelle à la dose de toxique administrée (au moins dans certaines limites) et dont la durée correspond à l'évolution, dans le temps, des lésions hépatocellulaires (19) (239) (243) (246). Du reste plusieurs auteurs ont noté l'abaissement des activités enzymatiques du foie en même temps que leur augmentation dans le sérum et cela pour de

TABLEAU VII

DYSFONCTIONNEMENT HEPATIQUE ET VARIATION DES DIFFERENTES ACTIVITES
ENZYMATIQUES DU SERUM
(d'après FAUVERT et BOIVIN 89)



nombreux enzymes, en particulier pour les déshydrogénases lactique, malique, la sorbitol déshydrogénase, la S G O T et la S G P T (6) (19) (175).

Les modifications enzymatiques qui, dans le cas des transaminases notamment ou des déshydrogénases, sont spectaculaires, constituent une réponse extrêmement sensible à l'agression toxique puisqu'elles se manifestent dès les premières heures qui suivent l'intoxication et évoluent de la même façon que les lésions histologiques (18) (117).

Les transaminases sont certainement les enzymes les plus étudiées et dont le dosage est le plus fréquent en clinique. Le coeur et le foie étant les organes les plus riches en transaminases ce sont les nécroses cardiaque et hépatique qui ont été essentiellement étudiées : Tableau VIII. (11) (225).

TABEAU VIII

VALEURS DES TRANSAMINASES DU SERUM
ET DE DIFFERENTS TISSUS CHEZ L'HOMME
(unités par gramme)

	G.O.T.	G.P.T.
Coeur	156.000	7.100
Foie	142.000	44.000
Muscle strié	99.000	4.800
Rein	91.000	19.000
Pancréas	28.000	2.000
Rate	14.000	1.200
Poumon	10.000	700
Sérum	20	16

HOLANDER et WROBLEWSKI (155) ont administré par sonde gastrique à des rats de 200 grammes des doses répétées de CCl_4 . Dans le groupe ayant reçu 0,4 ml du toxique des taux de 370 à 480 unités de SGOT ont été trouvés (témoins 170-340), le groupe ayant reçu 0,8 ml

atteint 700 à 800 unités avec retour à la normale après 2-4 jours. Chez les animaux qui reçurent 1,2 ml, les S G O T montèrent jusqu'à 1600-4000 unités/ml et revinrent à leur valeur normale après 12 jours. Les auteurs constatèrent également le parallélisme entre l'intensité des lésions biologiques et les modifications de la S G O T. Comparant enfin les variations de cet enzyme à celles de la cholinestérase et de la phosphatase alcaline, ils trouvèrent les augmentations suivantes : Cholinestérase : 50 %, phosphatase alcaline : 220 % et S G O T : 1000 %. Chez le chien, toujours intoxiqué au CCl_4 , il fut constaté une dissociation entre les cinétiques de la S G O T et de la S G P T : le pic de la S G P T est plus tardif et plus élevé que celui de la S G O T et le déclin beaucoup plus lent.

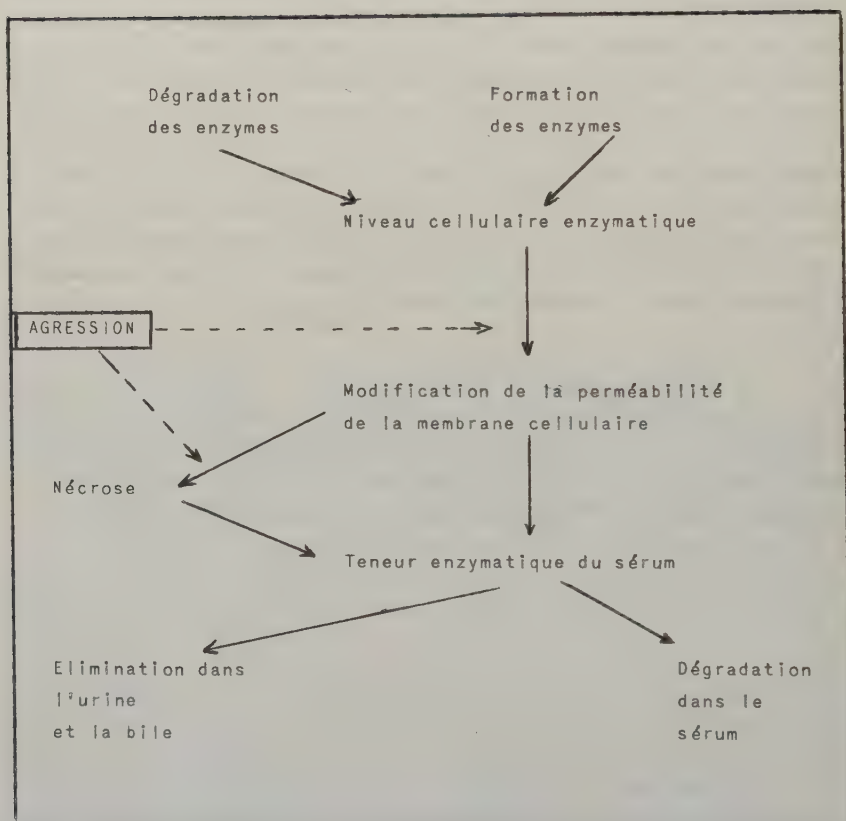
FRIEND, WROBLEWSKI et LA DUE ont étudié les variations de la S G O T au cours de l'hépatite virale d'inoculation de la souris. L'augmentation est proportionnelle à la dose de virus inoculée, au titre de virus présent dans le sang et à l'importance des lésions de nécrose hépatique (99). DE RITIS et ses collaborateurs ont montré au cours d'une expérimentation similaire avec le virus MHY 3 de Gledhill, que l'élévation de la S G P T dépassait celle de la S G O T tandis que dans le foie la T G P s'abaissait plus que la T G O (190).

L'ensemble des travaux menés soit sur l'animal in toto, soit sur le foie perfusé permet de penser que l'élévation des transaminases du sérum observée au cours des hépatites aiguës est en rapport direct avec la cytolyse.

Comme on l'a vu dans le tableau VII les transaminases ne sont pas les seuls enzymes évoluant lors d'une atteinte hépatique. Que ce soient les aldolases (201), les enzymes de la glycolyse et de la glycogénolyse (phosphohexoisomérase, phosphoglucomutase, déshydrogénase lactique), les enzymes de la dégradation aérobie du glucose et du métabolisme des pentoses (glucose 6 P. déshydrogénase), les enzymes du cycle de KREBS (déshydrogénases malique, isocitrique, succinique) ou les enzymes du métabolisme protidique, tous reflètent plus ou moins spécifiquement, par une augmentation de leur activité sérique, l'apparition d'un syndrome de cytolyse.

Nous ne nous étendrons pas sur les modifications de l'activité de tous les enzymes lors d'intoxications hépatiques chez l'animal, excepté en ce qui concerne la déshydrogénase lactique (117). Au cours de l'hépatite expérimentale du rat au CCl_4 (0,5 ml par rat par voie sous cutanée) on note une élévation extrêmement importante de son activité sérique (de 160 μ /ml à 30.000 μ /ml), la valeur maximale étant atteinte à la 24ème heure (19). En clinique humaine tous les auteurs notent dans les hépatites aiguës une élévation de la L D H sérique dont le sommet coïncide avec celui des transaminases (117). Mais cette détermination serait peu spécifique car de fortes activités se rencontrent dans les anémies pernicieuses, dans la mononucléose infectieuse sans atteinte hépatique, dans les insuffisances cardiaques et rénales et surtout dans les cancers généralisés. Nous avons cependant utilisé ce test car d'une part il est très facile à réaliser et d'une grande sensibilité lors des intoxications hépatiques et d'autre part le choix d'un nombre suffisant d'animaux témoins permet d'éliminer les causes d'erreurs.

En résumé, pour l'ensemble des variations enzymatiques que nous venons de passer en revue et qui sont rencontrées lors des atteintes nécrosantes du parenchyme hépatique, il est logique de souscrire au schéma de HAUSS et LEPPelman et repris par AUZEPY (113) (9).

FIGURE 4

Parmi tous les enzymes sériques dosés couramment en pathologie hépatique, notre choix était difficile à faire. C'est pourquoi, lors d'intoxications au tétrachlorure de carbone chez le rat et le lapin nous avons dosé systématiquement les enzymes suivants :

- Les transaminases G O T et G P T
- La leucine amino peptidase
- La phosphatase alcaline
- L'aldolase
- Les déshydrogénases lactique, malique et sorbique.

Le dosage de ces différents enzymes a été facilité par l'existence de techniques courantes dont les réactifs existent tout préparés dans le commerce.

Des résultats obtenus tant chez le rat que chez le lapin, il en est ressorti que les transaminases et les déshydrogénases étaient de loin les enzymes dont la teneur dans le sérum augmentait le plus à l'occasion d'une cytolyse hépatique. C'est pourquoi dans notre travail dont les résultats sont consignés plus loin nous sommes contents de doser, quand cela présentait un intérêt, soit la L D H sérique soit la S G O T.

Par la suite nous avons adapté la technique de dosage de l'ornithine-carbamyl-transférase en vue de la simplifier à l'extrême et permettre de la pratiquer en routine. Les résultats concernant cet enzyme montrent que l'évolution de son taux au cours des hépatites expérimentales est parallèle à celle des taux de déshydrogénase lactique ou de transaminase.

TECHNIQUES DE DOSAGES

TRANSAMINASE GLUTAMIQUE - OXALACETIQUE

Cet enzyme catalyse la réaction :



La G.O.T. peut être appréciée par quatre procédés : Chromatographie, spectrophotométrie, colorimétrie et manométrie. Toutes ces méthodes reposent sur le principe suivant : lorsqu'on met en présence une source d'enzyme, un substrat d'acide aspartique et d'acide α cétoglutarique, dans des conditions déterminées de concentrations respectives de ces deux corps, de température et de pH, les quantités d'acide glutamique et d'acide oxalacétique produites sont proportionnelles à l'activité enzymatique. La technique spectrophotométrique est basée sur le couplage à la réaction de transamination d'une réduction de l'oxalacétate en malate par le DPNH en présence d'un excès de déshydrogénase malique. L'oxydation du DPNH en DPN est alors suivie au spectrophotomètre par une diminution de la densité optique à 340 m μ et la vitesse de disparition du DPNH est sous certaines conditions proportionnelle à la concentration en transaminase (244). Cette technique est plus rapide que la méthode colorimétrique mais nécessitant une prise d'essai de l'ordre de 0,5 ml de sérum, nous lui avons préféré cette dernière.

La méthode colorimétrique repose sur la production d'acide pyruvique par décarboxylation de l'acide oxalacétique en acide pyruvique + CO². On peut admettre que dans des conditions déterminées la quantité d'acide pyruvique est proportionnelle à celle d'acide oxalacétique qui elle-même dépend de l'activité de la TGO.

REITMAN et FRANKEL ont décrit une méthode très simple où les conditions expérimentales comprennent une incu-

bation à 37° pendant 60 minutes; la solution colorée finale est un mélange des dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques présents, ceux du substrat et ceux produits par la réaction enzymatique : la longueur d'onde de 505 m μ est celle où la différence de densité optique entre les phénylhydrazones des acides cétoniques formés dans les conditions de l'expérience et celles des acides cétoniques du substrat est maximale. La coloration obtenue est comparée à celles données par des solutions titrées d'acide pyruvique. (185).

Nous avons utilisé cette technique dont les réactifs sont commercialisés, car elle permet de doser la S G O T avec des prises d'essai de 0,1 ml de sérum ou de dilution (au 1/5 pour les rats).

Quatre réactifs sont nécessaires :

- 1) Substrat S G O T : solution d'acide aspartique et d'acide céto glutarique à pH 7,5
- 2) Solution de 2-4 dinitro phénylhydrazine
- 3) Solution standard de pyruvate de sodium.
- 4) Soude à 0,4 N.

Pipeter dans un tube à essai 0,5 ml du substrat et y ajouter 0,1 ml de sérum ou de dilution de celui-ci. Placer au bain-marie à 37° pendant une heure, puis ajouter 0,5 ml de D N P H, mélanger et laisser 20 minutes à la température du laboratoire. Ajouter alors 5 ml de NaOH 0,4 N, attendre 5 minutes et photométrer à 505 m μ . On se reportera sur la courbe d'étalonnage préalablement établie à partir de la solution témoin et on aura immédiatement la valeur en unité de Reitman-Frankel.

LACTICO DESHYDROGENASE

Cet enzyme réduit les α céto acides, en particulier l'acide pyruvique et les α - γ dicéto acides en présence de DPN-H.

Dans la technique de CABAUD et WROBLEWSKI (44) le principe est le suivant : l'acide pyruvique en présence

de D P N H est transformé sous l'influence de la déshydrogénase lactique en acide lactique.



La quantité d'acide pyruvique transformée en acide lactique est directement proportionnelle à l'activité enzymatique. Dans la méthode de CABAUD et WROBLEWSKI le pyruvate non transformé est dosé par la dinitrophénylhydrazine (DNPH)

Nous avons préféré la technique spectrophotométrique beaucoup plus rapide. Dans la réaction ci-dessus, dont l'équilibre est nettement en faveur de la formation de lactate + DPN, on mesure l'activité de la LDH par la vitesse de disparition du DPNH. Il suffit donc de placer dans une cuve une solution de pyruvate, une quantité donnée de DPN-H et 0,1 ml de sérum ou de dilution de celui-ci et de lire la chute de la densité optique à 340 m μ . Le résultat est exprimé en unités Wroblewski : 1 unité est la quantité de LDH contenue dans 1 ml de sérum qui, à 22-24° et à 340 m μ , dans un volume de 3 ml, modifie la densité optique du DPN-H de 0,001 par minute.

N.B. Les réactifs concernant le dosage des transaminases et de la LDH par colorimétrie sont commercialisés par B.D. MERIEUX (Marcy-l'Etoile - Rhône). Les techniques colorimétriques sont nécessaires si l'on ne possède pas de spectrophotomètre en U.V.

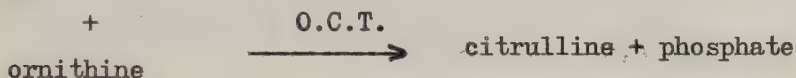
Les réactifs concernant les dosages par spectrophotométrie sont commercialisés par BOEHRINGER représenté en France par EUROBIO (Paris).

L'ORNITHINE CARBANYL TRANSFERASE

L'élévation de l'O C T sérique représente en clinique à l'heure actuelle un des signes les plus spécifiques de l'atteinte de l'hépatocyte.

Au cours du cycle de KREBS cet enzyme intervient dans la réaction :

Carbamyl-phosphate



et c'est ce même enzyme qui catalyse l'arsénolyse et la phosphorolyse de la citrulline.



C'est cette seconde réaction qui permet à REICHARD de mettre au point deux méthodes de dosage de l'O.C.T. La première repose sur le dosage du $^{14}\text{CO}_2$ formé à partir de Citrulline marquée. La seconde est basée sur l'évaluation par le réactif de NESSLER de l'ammoniaque libéré en cellule de Conway (183) (184).

Cette seconde technique a vu sa sensibilité améliorée par l'utilisation du réactif de Berthelot(73bis) et dernièrement un nouveau mode opératoire consistant à doser la citrulline formée à partir de carbamyl-phosphate + ornithine en présence d'enzyme, a été mis au point par LELUAN. Ce procédé a le mérite, en clinique, de donner des résultats beaucoup plus rapides mais par contre la technique est plus complexe que celle que nous avons employée.

Nous avons utilisé la seconde méthode de REICHARD mais en simplifiant la technique de dosage de l'ammoniaque libérée; Pour cela nous avons repris le procédé préconisé par BIZOLLON pour la détermination rapide de l'ammoniémie et qui consiste en une diffusion, dans un flacon de pénicilline, de l'ammoniaque déplacée par du CO_3K_2 et captée par un agitateur préalablement trempé

dans une solution de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$. Après diffusion l'agitateur est plongé dans du réactif de NESSLER qui est alors photométré.

R E A C T I F S

Pour l'incubation

R.1 - Tampon arséniate

Arséniate de sodium 0,5 M à pH 7,15 (15,6 g. d' $\text{AS O}_4 \text{ Na}_2 \text{ H}$, 7 H_2O pour 100 ml d'eau bidistillée, ajuster à pH 7,15 avec du ClH N).
Conserver à + 4° C.

R.2 - Substrat citrulline

Dissoudre 0,350 g. de DL citrulline dans 10 ml de tampon arséniate et conserver à + 4° C.

R.3 - Acide perchlorique 4 N

37,5 ml d'acide perchlorique à 65 % dans 100 ml d'eau bi-distillée.

R.4 - Solution saturée de CO_3K_2

125 g de CO_3K_2 dans 100 ml d'eau bi-distillée.
Ébullition 10 minutes et décantier.

R.5 - Réactif de Nessler au 1/10

Réactif de Nessler : dans un flacon de 300 ml, introduire 20 g d'iodure de potassium, 30 g d'iodure mercurique et 50 g environ d'eau bi-distillée. Chauffer jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir. Ajouter 200 ml d'eau bi-distillée. Agiter, laisser déposer et filtrer dans une fiole jaugée de 500 ml. Ajouter alors au liquide 50 g d'hydroxyde de sodium préalablement dissous dans 150 ml d'eau bi-distillée puis compléter à 500 ml avec de l'eau bi-distillée. Mélanger et laisser reposer 48 heures.

Diluer au 1/10 au moment de l'emploi avec de l'eau bi-distillée.

R.6 - Acide sulfurique N

Etalon d'ammoniaque

- Sulfate neutre d'ammonium pur 0,4716 g.
- Acide sulfurique N/50 Q S P 100 ml

Solution à 100 μ g d'azote ammoniacal par ml.

A partir de cette solution préparer une gamme étalon de 0,5 à 5 μ g pour 0,2 ml (2,5 à 25 μ g/ml).

Matériel

- tubes à hémolyse
- flacons type Pénicilline avec bouchon caoutchouc traversé par un agitateur dont l'extrémité se trouve à 1 cm du fond du flacon
- étuve à 37°
- Mélange sulfochromique à l'eau bi-distillée pour la verrerie.

Dosage

Dans deux tubes à hémolyse, lavés au mélange sulfochromique, rincés à l'eau bi-distillée, mettre 0,25 ml de sérum, ajouter dans l'un 0,25 ml de tampon arséniate et dans l'autre 0,25 ml de substrat citrulline.

Laisser 24 heures à l'étuve à 37°, puis ajouter dans chaque tube 0,05 ml d'acide perchlorique 4 N et centrifuger 10 minutes à grande vitesse.

Prélever 0,275 ml de surnageant (correspondant à 0,125 ml de sérum) et le mettre dans un flacon type pénicilline. Faire de même pour le témoin.

Préparer d'autre part dans une série de flacons la gamme étalon (0,2 ml dans chaque flacon correspondant à des quantités d'N ammoniacal comprises entre 0 et 5 μ g).

Ajouter alors dans tous les flacons 1 ml de solu-

lution saturée de CO_3K_2 et boucher rapidement, l'agitateur ayant été préalablement plongé dans l'acide sulfurique N et secoué pour qu'il ne puisse pas y avoir d'acide qui tombe dans le flacon. Mélanger alors en imprimant au flacon un mouvement rotatif sur lui-même en prenant beaucoup de précautions pour que le liquide ne vienne pas au contact de l'agitateur. Porter alors les flacons une heure à 37° en venant les agiter une ou deux fois.

Pendant la diffusion préparer une série de tubes à hémolyse contenant 2 ml de réactif de NESSLER. Après une heure, sortir les flacons de l'étuve, retirer délicatement le bouchon et l'agitateur et plonger ce dernier dans le réactif de NESSLER.

Photométrer au colorimètre de Meunier, écran bleu 47, diaphragme 15-15.

Déduire le témoin de l'essai et se reporter sur la courbe étalon.

Les résultats sont exprimés en microgrammes d'azote ammoniacal produits dans les conditions expérimentales décrites avec 1 ml de sérum.

Les dosages doivent être pratiqués avec du sérum frais provenant d'animaux à jeûn.

Chez la souris mâle normale la teneur du sérum en ornithine-carbonyl-transférase est relativement plus élevée que chez l'homme. Comme chez ce dernier du reste, certains sujets n'en ont pratiquement pas. La moyenne des résultats obtenus chez 120 animaux adultes soumis à un régime normal (provenant A.E.C.) est de $4,8 \pm 2,7 \mu\text{g}$ d'azote ammoniacal produit par ml de sérum. La répartition est donnée dans la figure 5 (page 85).

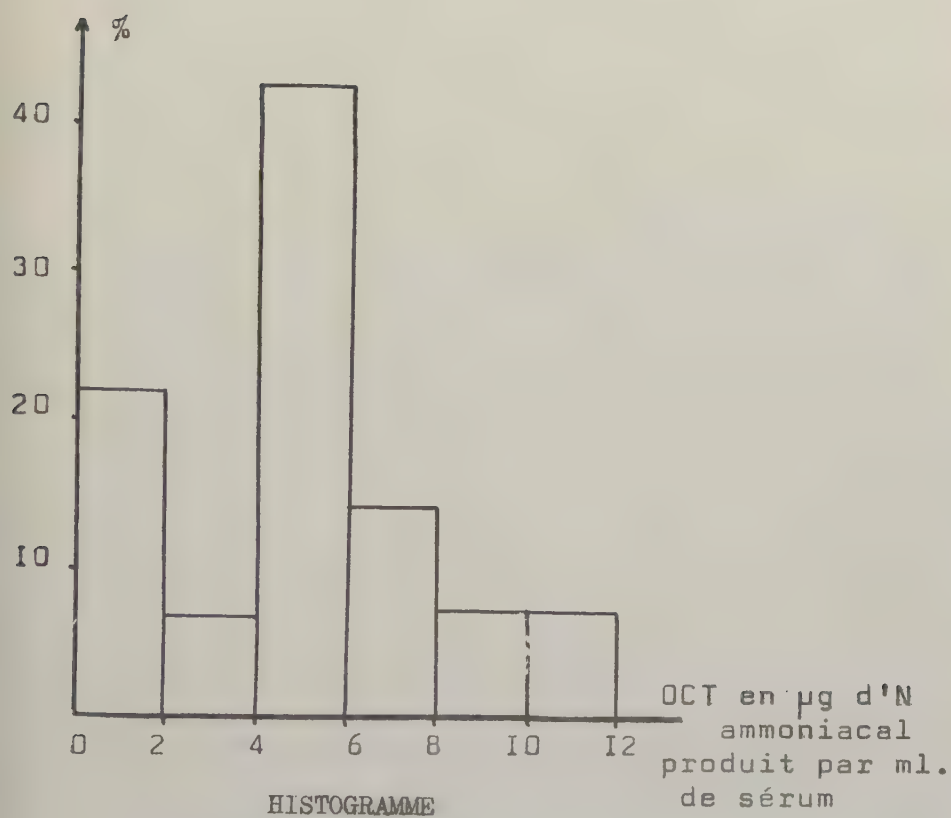


FIGURE 5

II - 3

TESTS A LA B.S.P.

Une des fonctions importantes du tissu hépatique réside en l'excrétion biliaire de substances biologiques ou non. Ce phénomène peut correspondre à une simple filtration mais dans le cas de certains composés, notamment des colorants, ceux-ci sont retrouvés dans la bile à des concentrations tellement plus élevées que dans le sang qu'on ne peut l'expliquer sans faire intervenir un processus sécrétoire. Le premier colorant utilisé pour étudier la fonction chromagogue du foie fut l'indigo-carmin que CHRZON SZCZEWSKY en 1866 retrouva dans l'urine et les canalicules biliaires sur des préparations histologiques. En 1909 ABEL et ROWNTREE découvrirent que certaines phtaléines halogénées étaient éliminées dans la bile en fortes proportions. Les travaux se multiplièrent alors pour aboutir vers 1930 à l'emploi de la tétraiodotétrachloro fluorescéine ou rose bengale dont l'emploi a été vulgarisé par FIESSINGER (92). Ayant présenté des propriétés photosensibilisatrices et hémolytiques aux doses nécessaires, ce produit a laissé la place à un corps voisin d'innocuité totale aux doses exploratrices: la phénoltétrabromophtaléine disulfonate de sodium ou B.S.P. dont l'emploi était déjà préconisé en 1925 par ROSENTHAL et WHITE (191). (*)

Les recherches expérimentales sur l'épuration sanguine de ce dernier colorant (KLEIN 129) (KREBS 134), sur son élimination biliaire (CANTAROW 50) et les études de BRAUER (38) (36) sur le foie in vitro, ont conduit à admettre que la première partie de la courbe d'épuration correspondait à une accumulation du colorant dans le parenchyme hépatique tandis que la seconde partie, la plus modifiée dans les états pathologiques, reflétait l'élimination biliaire. Il faut savoir cependant que la B.S.P. ne s'élimine pas uniquement dans la bile mais que l'on en retrouve dans l'urine en quantité non négligeable de sorte que certains auteurs pensent que, le paramètre rénal étant constant (reins fonctionnant correctement), l'excrétion rénale de la B.S.P. informerai t suffisamment de l'état fonctionnel du foie.

(*) Le rose bengale est toutefois utilisé de nouveau sous forme de molécule marquée à l'iode 131 pour l'exploration fonctionnelle du foie par gammagraphie.

Des travaux récents ont d'ailleurs confirmé qu'il n'y a aucun rapport entre les éliminations biliaire et urinaire de la B.S.P. et du rouge de phénol, lorsque celles-ci sont modifiées par administration simultanée d'agents pharmacologiques (218). Quoiqu'il en soit, les tests de clearance à la B.S.P. souvent mis en concurrence avec d'autres (or colloïdal) sont toujours très utilisés en clinique (86) (110).

L'épuration sanguine de la B.S.P. et son élimination biliaire dépendent, quant à leur cinétique, de différents paramètres dont le plus important est la quantité injectée; BOURDON (35) a souligné l'importance de ce facteur en donnant les diverses courbes d'épuration obtenues chez le rat blanc avec des doses croissantes de B.S.P. Chez l'homme les doses injectées sont faibles, de l'ordre de 5 à 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ce qui est suffisant car la cinétique d'épuration est dans ce cas bien plus lente que chez le petit animal, ce qui permet des prises de sang espacées. (51). Toutefois GALLI (103) préconise le dosage de la B.S.P. sanguine en continu (autoanalyseur) procédé infiniment plus valable suivant l'auteur pour suivre le phénomène.

Mais si, en clinique, l'utilisation de ce test est simple et si son interprétation a toujours une valeur générale, l'emploi de la B.S.P. en expérimentation animale laisse entrevoir pour l'avenir de nouvelles possibilités. Jusqu'en 1950 les substances colorées dosées dans le sérum ou la bile n'étaient pas différenciées de la B.S.P. injectée; en 1950 la chromatographie de la bile démontrait l'existence de dérivés colorés métabolites de la B.S.P. (41) (60). Combinés avec le colorant on a décelé du glycocolle, de la cystéine et de l'acide glutamique. Par chromatographie sur colonne de la B.S.P. marquée au S^{35} KREBS a isolé trois composés I, II, III et l'étude de l'apparition chronologique de ceux-ci dans la bile a montré l'existence de la séquence B.S.P. -III II - I (40) (134). Étudiée chez des animaux soumis à une stase biliaire d'origine mécanique ou toxique (CCl_4) la cinétique d'élimination de la B.S.P. et de ses métabolites a montré que la conséquence immédiate de l'atteinte hépatique est un arrêt de l'excrétion de la B.S.P. qui précède la diminution de la sécrétion de la bile. Un tel processus différencie donc les deux phénomènes.

Cependant des travaux encore plus récents de WHELAN et PLAA (240) utilisant la chromatographie en couche mince aboutirent à la séparation de 6 fractions inégalement réparties dans la bile chez la souris, le rat, le lapin et le chien, certaines d'entre elles n'existant du reste pas chez l'un ou l'autre de ces animaux. Etudiant l'évolution de la stase biliaire chez le cobaye et de l'intoxication au CCl_4 et à l' α naphthyl isothiocyanate chez le rat, ces mêmes auteurs ont noté que certaines fractions disparaissent tandis que d'autres augmentent au cours de l'intoxication et de la récupération.

Mais en attendant que le test à la B.S.P. devienne qualitatif, l'information quantitative qu'il donne sur l'ensemble fonctionnel du foie est utilisée couramment en toxicologie pour évaluer une atteinte hépatique expérimentale (109) (221) et en pharmacologie pour mesurer soit une activité hépatoprotectrice (198) (159) soit la toxicité éventuelle de médicaments (72).

L'étude pharmacologique de l'épuration sanguine et de l'élimination biliaire de la B.S.P. peut se faire soit sur l'organe isolé et perfusé, soit sur l'animal *in vivo*.

Les premières études du métabolisme de la B.S.P. sur le foie isolé et perfusé remontent aux travaux de KREBS, BRAUER et PESSOTI (37) (39). Plus récemment la technique a été reprise par PLAA puis par JEUNET et QUITT (173) (124). PLAA a étudié sur le foie normal et intoxiqué par des doses croissantes de CCl_4 et prélevé à des temps déterminés l'épuration de la B.S.P. présente dans le liquide de perfusion et son élimination biliaire en fonction de différentes concentrations en colorant. JEUNET et QUITT ont décrit un appareil type coeur-poumon artificiel grâce auquel ils ont étudié sur le foie de rat certains problèmes d'enzymologie clinique par intoxication *in vitro* de l'organe, pendant la perfusion, au 2 - 4 dinitrophénol et au CCl_4 (124).

Mais c'est évidemment sur l'animal entier que le test à la B.S.P. est le plus souvent pratiqué et les

conditions expérimentales en ont été précisées par G. BOURDON (35).

En résumé, BRAUER a montré que les tissus et organes pouvaient se diviser en deux catégories : ceux qui captent la B.S.P. à un taux élevé indépendant de la concentration (foie) et ceux, tel le muscle strié, qui ne le retiennent qu'en très faible proportion. A faible dose, seuls les premiers entrent en jeu; à forte dose (100-150 mg/Kg) il reste une quantité de colorant suffisante pendant un temps assez long pour que les tissus de la seconde catégorie puissent capter de la B.S.P. en quantité non négligeable. Aussi avons-nous mesuré l'élimination biliaire chez le rat pour des doses croissantes de B.S.P. de 15 à 100 mg/Kg et comme d'autres auteurs (35) nous avons obtenu des courbes d'allures très différentes. La rupture entre les phénomènes d'élimination et d'épuration est mise en évidence par la mesure d'un troisième facteur qui est le temps d'apparition de la B.S.P. dans la bile. Certains auteurs l'ont mesuré systématiquement et ont trouvé des résultats très significatifs dans le cas d'intoxication au CCl_4 (12) (198). Pour notre part, nous n'avons pas retrouvé de telles différences entre les animaux intoxiqués et témoins et en raison de leur dispersion, les chiffres obtenus ne nous ont pas semblé très significatifs.

Si de nombreux travaux concernent l'étude du métabolisme de la B.S.P. chez le rat ou le cobaye il en est cependant fort peu qui font état de résultats obtenus chez la souris. Les travaux de KUTOB et PLAA ont montré cependant que cet animal pouvait très bien convenir pour l'étude de l'épuration sanguine en tant que test global de l'intégrité hépatique (137) (138). (*) Ces derniers auteurs ont étudié la courbe d'épuration chez la souris mâle Swiss pour des doses différentes de B.S.P. injectées par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. KUTOB et PLAA ont préconisé d'une part la dose de 100 mg/Kg en intraveineuse qui est en quelque sorte la dose de saturation et d'autre part la prise d'essai aux temps 15 et 30 minutes après l'injection.

(*) Il semble que le test d'épuration chez la souris soit actuellement considéré comme parfaitement valable pour mesurer l'hépatotoxicité de différents agents en raison de la facilité de mise en oeuvre et de la possibilité d'opérer sur des lots importants d'animaux.

Ainsi il semble que dans ce domaine la pharmacologie rejoigne la clinique et que nous pouvons adopter les conclusions suivantes empruntées à FAUVERT (88) :
"La mesure de la clearance sanguine de la B.S.P. constitue certainement le test le plus sensible et le plus quantitatif de la masse fonctionnelle du foie dont nous disposons actuellement."

Aussi nous croyons que ces caractéristiques justifient la place de choix qui revient au test à la B.S.P. dans une étude "screening" de médicaments éventuellement hépatoprotecteurs.

TEST D'EPURATION SANGUINE DE LA B.S.P. CHEZ LA SOURIS

Cette étude a été conduite chez la souris (souris albinos SWISS, adultes de $20 \text{ g} \pm 3$). Des essais préalables nous ont amené à injecter le colorant (veine caudale) à la dose de 100 mg/Kg en injection intraveineuse rapide ($0,2 \text{ ml}$ d'une solution à 10 mg/ml pour une souris de 20 grammes en moins de 5 secondes). Nous avons essayé d'autre part les doses de 50 mg/Kg et 150 mg/Kg que nous avons abandonnées car dans le premier cas la quantité de B.S.P. est trop vite éliminée et dans le second cas nous nous trouvons avec une dose trop proche de la DL_{50} (250 mg/Kg).

La dose de 100 mg/kg représente en quelque sorte une saturation du parenchyme hépatique et ceci est prouvé par le fait que chez des animaux sérieusement atteints sur le plan hépatique, l'injection d'une telle quantité est très souvent fatale à l'animal tandis qu'elle ne l'est jamais pour un animal témoin.

A des temps déterminés après l'injection le sang est recueilli par décapitation, par ponction cardiaque ou dans le sinus rétro-orbitaire, puis il est centrifugé et la B.S.P. est dosée par colorimétrie directe du sérum dilué au $1/20$ ou au $1/100$ dans une solution de soude $0,002 \text{ N}$ (cuves de 10 mm , $\lambda = 580 \text{ m}$). Toutes les mesures ont été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales, une dilution au millième de la solution injectée servant de témoin.

Dans un premier essai, nous avons déterminé la cinétique normale d'élimination de la B.S.P. chez la souris mâle et femelle. Les dosages ont été effectués sur des sérums prélevés 20 secondes , 1 , 5 , 10 et 15 minutes après l'injection du colorant. Chaque détermination représente la moyenne des résultats obtenus avec 15 animaux faisant partie d'un lot homogène. La valeur 100% au temps zéro, a été déterminée par le calcul sur la base d'une volémie représentant le $1/15$ du poids du corps et d'un hématoците à 60% .

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau suivant :

TABLEAU VI

TEST D'EPURATION SANGUINE DE LA B.S.P. CHEZ LA SOURIS

RETENTION DE LA B.S.P. en p.100 ($\pm$ E)						
ANIMAUX	TEMPS 0	Après 20 sec.	Après 1 min.	Après 5 min.	Après 10 min.	Après 15 min.
Souris MALES	100 %	78 $\pm$ 6	54 $\pm$ 4,5	12 $\pm$ 1,8	5,1 $\pm$ 0,8	3,5 $\pm$ 0,62
Souris FEMELLES	100 %	-	68 $\pm$ 7	15,2 $\pm$ 3,4	7,1 $\pm$ 1,8	4,9 $\pm$ 1,3

On en déduit qu'il existe de légères différences en fonction du sexe : l'épuration sanguine de la B.S.P. est, chez la souris femelle, légèrement inférieure à celle observée chez le mâle et nos essais ont été systématiquement effectués sur des souris mâles.

Compte tenu de l'allure de cette courbe et devant choisir pour la prise de sang un temps déterminé après l'injection, nous avons hésité entre 5 et 10 minutes. Nous avons donc intoxiqué des lots de 15 à 20 souris avec différents toxiques et avons mesuré la rétention de B.S.P. sérique après 5 et 10 minutes.

Les différences étant beaucoup plus significatives après 10 minutes, nous avons donc choisi arbitrairement ce temps pour évaluer chez la souris le test à la B.S.P.

Nous avons d'autre part vérifié sur deux lots de

souris si la B.S.P. présente dans le sérum après dix minutes ne perturbait pas le dosage de la L.D.H. sérique. Les résultats obtenus sur des sérums prélevés cinq minutes après l'injection de 100 mg/Kg du colorant nous permettent d'affirmer que la présence de celui-ci n'a aucune influence sur le dosage de la L.D.H.

EPURATION SANGUINE ET ELIMINATION BILIAIRE DE LA B.S.P. CHEZ LE RAT

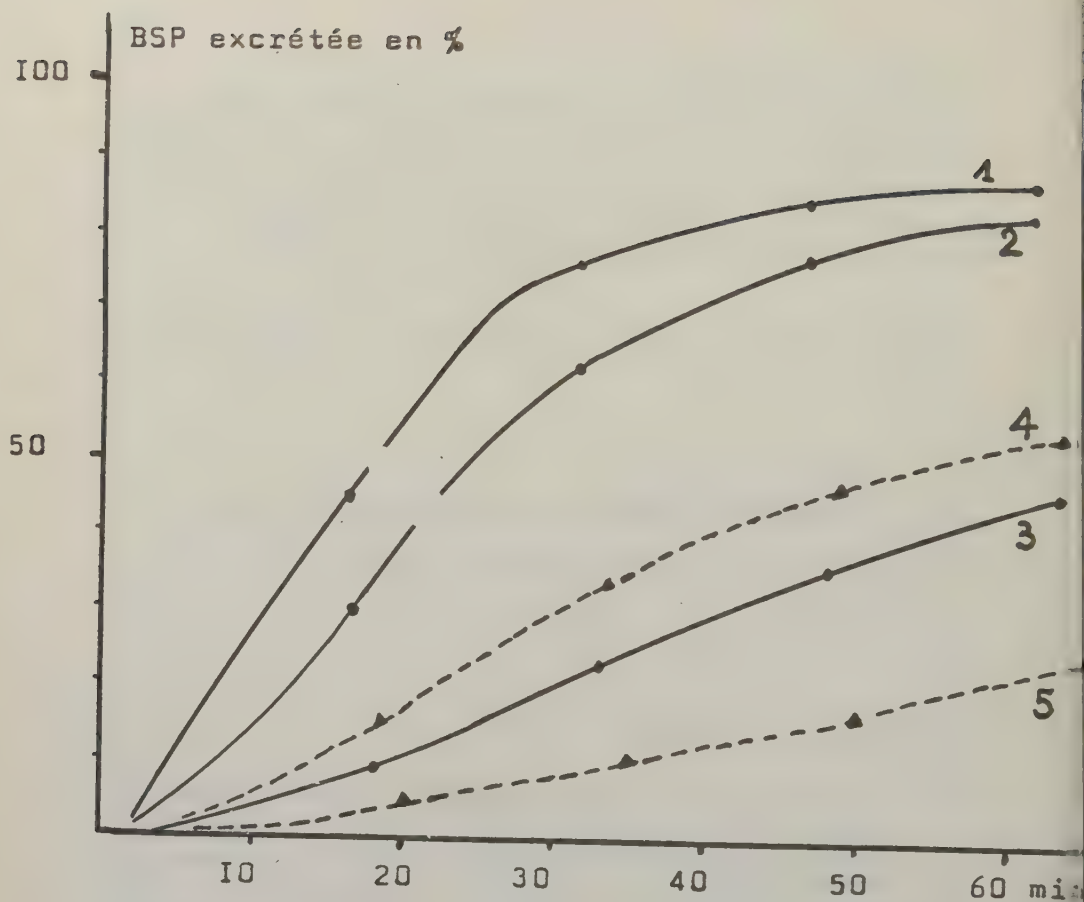
a) EPURATION SANGUINE

Les rats légèrement anesthésiés à l'éther reçoivent une injection intra-veineuse de B.S.P. (50 mg/Kg). Aux temps 1, 4, 10 et 20 minutes après l'injection on prélève du sang soit par ponction cardiaque soit à la queue. Après centrifugation les sérums sont dilués avec de la soude N/100 et photométrés à 580 m μ . La valeur obtenue pour la première prise de sang (après 1 minute) sera considérée comme 100 %. A partir de ce point on peut construire la courbe d'épuration sanguine.

b) ELIMINATION BILIAIRE

Les rats sont anesthésiés à l'uréthane 1 g/Kg par voie intrapéritonéale. Après incision au niveau du foie on dégage le duodénum et on canule le cholédoque à son niveau avec un cathéter de 10 cm de long.

On injecte la B.S.P. par voie intra-veineuse au temps 0 et on mesure le délai d'apparition du colorant dans la bile en plaçant à l'extrémité du cathéter un morceau de papier filtre imbibé de soude. Quand la B.S.P. apparaît on récolte la bile dans des tubes à essais par fraction de 15 ou 30 minutes. Après dilution on



TEMOINS 1 : 15 mg/Kg de BSP

2 : 50 " "

3 : 100 " "

INTOX. 4 : 15 " "

5 : 50 " "

) C Cl_4 - 1,2 g/Kg s.c. - 24 heures

FIGURE 6

Elimination biliaire de la B S P chez le rat normal et intoxiqué en fonction de la dose de colorant injectée.

photomètre puis compte tenu de la quantité absolue injectée on trace la courbe d'élimination. Il est très important de maintenir les animaux en état d'homéothermie et de vérifier leur température rectale régulièrement.

Nous avons expérimenté les doses de 15 mg, 50 mg et 100 mg/Kg de colorant et leur excrétion en fonction du temps. Compte-tenu de la forme des courbes d'élimination obtenues nous préconisons la dose de 50 mg/Kg et la mesure de l'élimination après 60 minutes. C'est dans ces conditions que l'on fait apparaître une plus grande différence entre les excrétions biliaires de B.S.P. d'animaux témoins et intoxiqués. (Voir résultats plus loin).

RESULTATS

Tous les résultats rapportés ci-après sont exprimés comme il a été déjà indiqué :

1. Pour les lipides : en pourcentage de lipides extraits de l'organe frais par la technique de Delsal.
2. Pour la S.G.O.T. : en unités Reitman-Frankel par millilitre de sérum frais.
3. Pour la L.D.H. sérique : en unités Wroblewski par millilitre de sérum frais
4. Pour l'O.C.T. sérique : en microgrammes d'azote ammoniacal produits, dans les conditions décrites, par 1 ml de sérum.
5. Pour la B.S.P. chez la souris : en pourcentage de B.S.P. restant dans le sérum dix minutes après une injection intraveineuse du colorant (100 mg/Kg).

Tous les résultats sont exprimés par la moyenne (m) et l'erreur relative à la moyenne (σ m.t) pour une probabilité de 95 p.100 ($m \pm \sigma$ m.t pour $P = 0,05$).

HEPATITES DIETETIQUES

Nous avons étudié l'évolution des lipides hépatiques et de la lacticodéshydrogénase chez la souris SWISS soumise à des régimes déséquilibrés sur les deux plans quantitatif et qualitatif.

A - ETUDE QUANTITATIVE

Les régimes étudiés sont les suivants :

- 1) Régime hypoprotéique (Régime 1)
- 2) Régime hyperlipidique (Régime 2)
- 3) Régime hypoprotéique et hyperlipidique (Régime 3 A).

Leur composition a été donnée plus haut (p 31) et l'hypoprotéidie des régimes 1 et 3 A correspond environ à $1/5 - 1/7$ d'une ration équilibrée.

Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux suivants :

TABLEAU VII

REGIME HYPOPROTEIQUE CHEZ LA SOURIS MALE

Variation des taux de lipides hépatiques et de L.D.H. sérique.

45 animaux	TEMOINS	Après 5 jours	Après 10 jours
LIP.HEP.	4,15 ± 0,22	4,5 ± 0,5	4,7 ± 0,44
L.D.H. x 10 ⁻³	2,6 ± 0,31	3,4 ± 0,42	5,2 ± 0,39
Poids des animaux (g.)	21 ± 2	-	20 ± 3

TABLEAU VIIIREGIME HYPERLIPIDIQUE CHEZ LA SOURIS MALE

Variation des taux de lipides hépatiques et de L.D.H. sérique.

45 animaux	Témoins	4 jours	7 jours	10 jours
Lip.Hép.	4,28 ± 0,35	6,6 ± 0,5	7,4 ± 1,15	8,05 ± 1,45
L.D.H. x 10 ⁻³	3,1 ± 0,36	3,4 ± 0,74	5,3 ± 1,2	4,8 ± 1,3
Poids des animaux (g)	23	-	-	22

TABLEAU IX

REGIME HYPOPROTEIQUE-HYPERLIPIDIQUE CHEZ LA SOURIS
MALE ET FEMELLE

Variation des taux de lipides hépatiques et de L.D.H. sérique.

	SOURIS MALES (100 animaux)				SOURIS FEMELLES (40 animaux)	
	Témoins	Après 4 jours	Après 7 jours	Après 10 jours	Témoins	Après 7 jours
LIP.HEP.	4,6 ±0,75	8,6 ±1,8	12 ± 3,1	13,5 ± 4,6	5,85 ±0,45	11,8 ± 1,65
L.D.H. x 10 ⁻³	3,2 ±0,42	3,6 ±0,72	9,5 ± 1,8	11,3 ± 2,3	4,1 ±0,55	10,5 ± 3,8
O.C.I.	4,6	14	10	-	4,9	11
Poids des animaux (g)	22	-	-	17	21	17

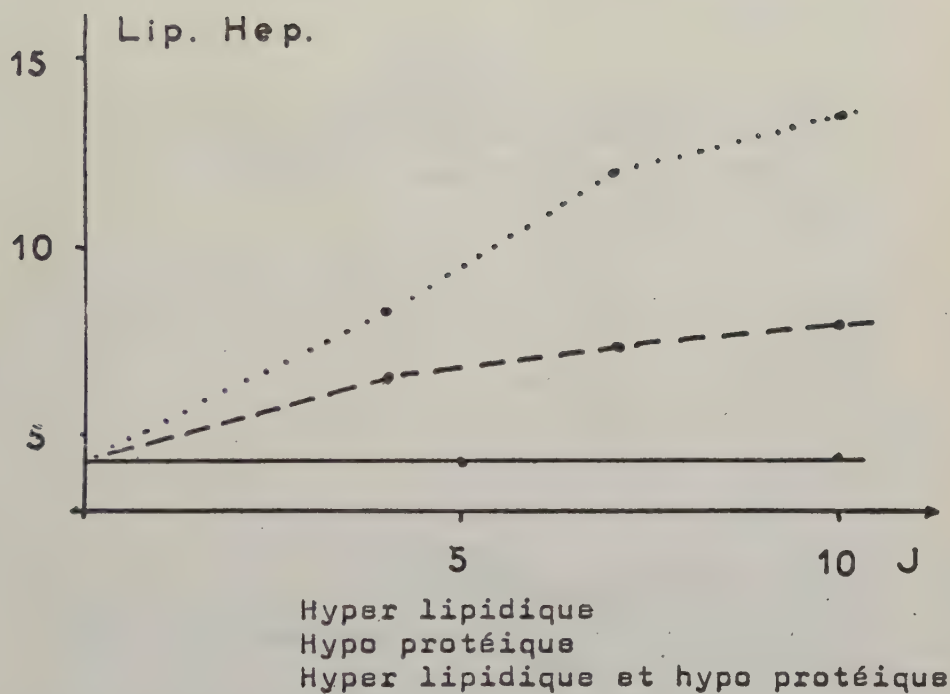


FIGURE 7

Variation des taux de lipides hépatiques chez la souris soumise à un régime déséquilibré.

Nous avons étudié chez la souris l'influence des lipides incorporés, en quantités égales, dans les régimes hyperlipidiques-hypoprotéiques.

Trois autres régimes ont été ainsi préparés avec de l'huile de tournesol, du saindoux de porc et de la margarine additionnée de cholestérol (0,5 % dans le régime). Dans ce dernier essai nous avons dosé simultanément les lipides et le cholestérol total du tissu hépatique. Le dosage du cholestérol a été pratiqué sur l'extractum lipidique par colorimétrie à l'aide de la réaction de Libermann.

TABLEAU X

RÉGIME HYPOPROTEIQUE-HYPERLIPIDIQUE (HUILE DE TOURNESOL)

Variations des taux de lipides hépatiques et de L.D.H. sérique chez la souris.

40 animaux	Témoins	5 jours	10 jours
LIP. HEP:	4,3 ± 0,48	5,05 ± 0,65	4,6 ± 0,32
L.D.H. x 10 ⁻³	3,8 ± 0,52	3,6 ± 0,85	6,2 ± 1,2

TABLEAU XI

RÉGIME HYPOPROTEIQUE-HYPERLIPIDIQUE (SAINDOUX DE PORC)

Variations des taux de lipides hépatiques et de L.D.H. sérique chez la souris.

60 animaux	Témoins	4 jours	7 jours	10 jours
LIP. HEP.	4,2 ± 0,30	10,3 ± 2,8	15,5 ± 3,5	17,5 ± 4,3
L.D.H. x 10 ⁻³	3,2 ± 0,35	4,8 ± 0,6	5,5 ± 0,95	9 ± 1,75

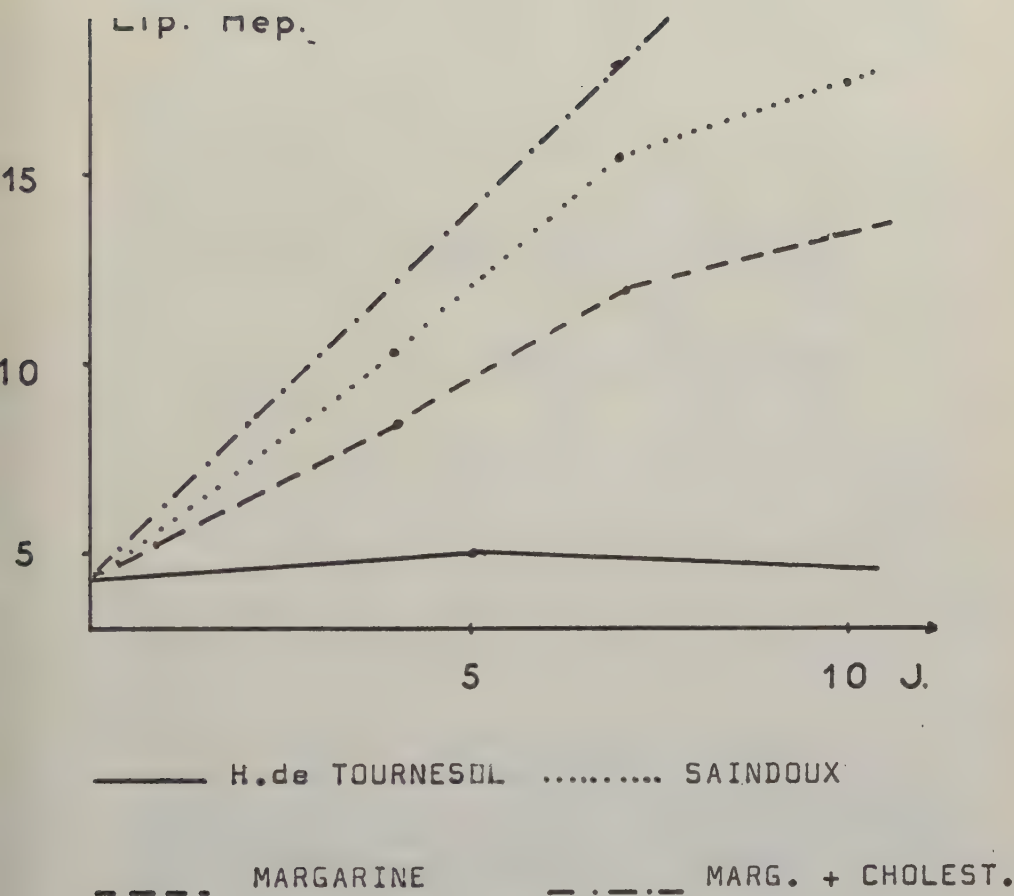


FIGURE 8

Influence qualitative des lipides sur la variation des taux de lipides hépatiques chez la souris soumise à un régime hypoprotéique-hyperlipidique.

TABLEAU XII

REGIME HYPOPROTEIQUE-HYPERLIPIDIQUE
(MARGARINE + CHOLESTEROL)

Variations des taux de lipides et de cholestérol hépatique en p. 100 du tissus frais.

	Souris ♂ régime hyperlip. hypoprot.		Souris ♂ régime id. enrichi en cholestérol		Souris ♀ Régime enrichi en cholestérol	
	LIP.HEP.	CHOLEST.	LIP.HEP.	CHOLEST.	LIP.HEP.	CHOLEST.
Témoin	4,6 ± 0,95	0,25	4,3 ± 0,6	0,27	6,45 ± 1,1	0,31
7 jours	11,5 ± 3,8	0,29	9,6 ± 2,2	1,1	17,1 ± 2,8	1,2

En conclusion on peut noter que seuls les régimes alliant une surcharge lipidique à une carence protidique sont susceptibles d'engendrer une stéatose. La surcharge en cholestérol peut induire une stéatose très importante mais celle-ci étant reconnue non pathologique et très rapidement réversible, nous n'avons pas cru devoir retenir cette technique dans notre protocole final.

* Pour des régimes beaucoup plus concentrés en cholestérol (2-3 %) tous les animaux mâles et femelles présentent des stéatoses très importantes indépendantes de la nature hyperlipidique-hypoprotéique du régime.

HEPATITES A L'ETHIONINE

L'éthionine, nous l'avons vu, joue un double rôle: en tant qu'analogue structural elle se substitue passivement, dans les régimes à la méthionine et ainsi elle correspond à une carence en ce facteur lipotrope; d'autre part elle perturbe activement la synthèse protéique au sein de l'hépatocyte.

Nous avons suivi les teneurs du foie en lipides hépatiques chez le rat et la souris mâles à la suite d'une injection de D L éthionine et chez des souris des deux sexes soumises à un régime dans lequel ce dérivé avait été incorporé à différentes concentrations.

A - EVOLUTION DE LA STEATOSE APRES UNE INJECTION D'ETHIONINE

1°) Chez le rat

Nous avons injecté par voie intrapéritonéale 500 mg/Kg d'éthionine à 12 rats mâles, souche Wistar, de 250 grammes environ. Les animaux ont été sacrifiés par groupes de trois : 24, 48 et 96 heures après l'injection et le dosage des lipides du foie nous a donné les résultats suivants :

TABLEAU XIII

Variation des taux de lipides hépatiques chez le rat après injection unique d'éthionine (500 mg/Kg).

Témoins	1 jour	2 jours	4 jours
	4,3	6,2	4,3
3,9	4,2	7,1	4,1
$\pm$ 0,42	5,8	6,2	4,3
	4,5	5,4	3,7

2°) Chez la souris

Ces essais ont été réalisés sur des souris SWISS (mâles 20-22 g).

* Cinétique de l'atteinte hépatique après une injection intrapéritonéale d'éthionine

TABLEAU XIV

Variation des taux de lipides hépatiques et de L D H sérique chez la souris après injection unique d'éthionine (1 g/Kg).

Nombre d'animaux	Temps	LIP.HEP.	L D H $\times 10^{-3}$
10	0	3,95	2,7
10	17 h.	4,4	-
15	24 h.	5,4	3,2
10	40 h.	5,75	-
15	48 h.	6	3,3
15	72 h.	5,1	3,8

* Atteinte et récupération hépatique après plusieurs injections d'éthionine - Effet préventif de la D L méthionine.

Une seule injection intrapéritonéale n'ayant pu faire apparaître d'atteinte hépatique, nous avons modifié le protocole adopté et avons répété les injections quatre fois à un jour d'intervalle. Les possibilités de récupérations après un "repos" de 48 heures et le pouvoir préventif de la méthionine ont été étudiés.

Deux lots de 45 souris ont été constitués et chaque lot divisé en 3 groupes de 15 animaux :

- 15 témoins
- 15 souris qui reçurent quatre jours de suite 1 g/Kg d'éthionine en i.p.

- 15 souris qui reçurent quatre jours de suite
1 g/Kg d'éthionine + 1 g/Kg de méthionine.

Le lot A a été sacrifié 24 heures après sa quatrième injection et le lot B trois jours après. Les résultats ont été les suivants :

TABLEAU XV

Atteinte et récupération hépatique après plusieurs injections d'éthionine chez la souris évaluées par les variations des taux de lipides hépatiques, de cholestérol et de L D H sérique.

90 animaux		LIP. HEP.	CHOLESTEROL	L D H $\times 10^{-3}$
LOT A	Témoins	4,6	0,27	3,7
	Ethionine	11,3	0,32	14,5
	Ethionine + Méthionine	6,8	0,28	5,8
LOT B	Témoins	4,3	0,23	3,2
	Ethionine	8,7	0,27	7,5
	Ethionine + Méthionine	4,5	0,26	4,9

B - INTOXICATION A L'ETHIONINE PAR INCORPORATION DU TOXIQUE DANS LE REGIME ALIMENTAIRE

Dans un premier temps nous avons incorporé l'éthionine dans la provende afin d'obtenir des concentrations allant de 0,1 à 0,8 %. Il a alors été constaté que la concentration de 0,1 % était incapable d'engendrer une stéatose après 3 semaines de régime. Par contre à la dose de 0,8 % l'éthionine est rapidement toxique et nous avons porté notre choix sur 0,3 %.

Dans ces conditions expérimentales la stéatose se développe très rapidement chez la souris femelle et de

façon variable chez la souris mâle. Suivant le poids présenté par les animaux au début de l'essai, la stéatose évolue plus ou moins vite comme le montrent les résultats consignés dans le tableau qui suit :

TABLEAU XVI

Variation des taux de lipides hépatiques chez la souris soumise à un régime à l'éthionine (0,3 %) en fonction du poids et du sexe des animaux.

	Témoin	2 jours	3 jours	4 jours	6 jours	8 jours	10 jours	14 jours
Souris ♂ 20-21 g	4,3	6,5	9,3	13,5	17	-	-	-
Souris ♂ 28-30 g	4,3	4,5	-	7,2	10,3	12,6	13,8	14,2
Souris ♀ 20-21 g	5,2	7,8	13,6	17,2	19,8	-	-	-

Ayant adopté le régime à 0,3 % d'éthionine nous avons étudié au cours de plusieurs essais l'atteinte hépatique alors induite chez la souris mâle de 20 à 21 grammes. En mettant en commun tous les résultats obtenus chez les animaux répondant à l'éthionine (*), le tableau d'atteinte hépatique obtenu chez 150 animaux est le suivant :

(*) En répétant maintes fois l'intoxication par régime de la souris mâle, il a été noté des différences de sensibilité très nettes et reproductibles suivant l'éleveur qui a fourni le lot expérimenté.

TABLEAU XVII

Variations de la rétention de B S P et des taux de lipides hépatiques, de L D H et d'O C T sérique chez la souris mâle soumise à la D L éthionine (0,3 %).

200 animaux environ	Témoins	2 jours	3 jours	4 jours	6 jours
LIP.HEP.	4,3	6,5	9,3 ± 3,8	13,5 ± 3,8	17 ± 4,5
Rétention B S P 10 minutes	5,3	9,3	16,5	21	19
L D H $\times 10^{-3}$	2,7	3,5	3,4	6,6 ± 1,4	7,7 ± 1,8
O C T	4,8 ± 2,7	-	-	59 ± 16	46 ± 18

On peut tirer de ces données que l'étude d'un antistéatosant chez la souris peut très bien se faire en utilisant l'éthionine comme agent toxique par voie orale. L'emploi de souris mâles est préconisé car chez la souris femelle la stéatose est d'emblée élevée, des paramètres hormonaux entrant directement en jeu.

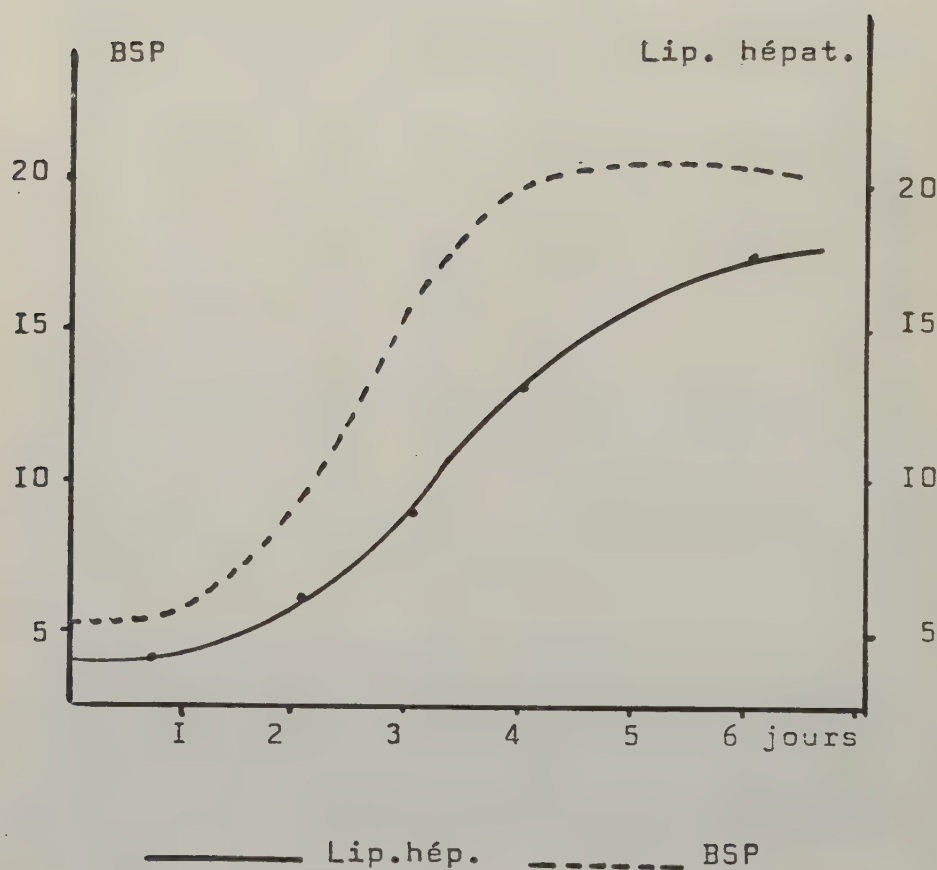


FIGURE 9

Variations des taux de lipides hépatiques et de la rétention de B S P chez la souris mâle soumise à un régime à 0,3 % de D L éthionine.

Les résultats obtenus ont mis en évidence trois impératifs : choisir des animaux provenant d'un même éleveur, les surveiller par observations et pesées répétées pendant 8 à 10 jours toutes les 48 heures et rejeter tout animal présentant soit une chute de poids soit un aspect maladif; utiliser un grand nombre d'animaux, plusieurs centaines si possible; diviser les animaux en trois lots d'égale importance : un lot témoin, un lot intoxiqué et un lot intoxiqué et traité. Des témoins et un grand nombre d'animaux par lot sont nécessaires pour éliminer autant que possible la variance d'environnement.

Pour étudier la cinétique, il faut plusieurs points expérimentaux. Toutefois, plutôt que de les multiplier, il est préférable de se limiter à 3 ou 4 et d'effectuer chaque détermination avec un nombre d'animaux suffisant, au minimum une trentaine.

HEPATITES AU TETRACHLORURE DE CARBONE

L'intoxication au tétrachlorure de carbone reste la méthode type de création d'atteinte hépatique évoluant vers la cirrhose. Ces essais ont été effectués chez le rat et la souris. Deux techniques ont été étudiées : l'injection par voie sous cutanée et l'inhalation du toxique.

A - INTOXICATION PAR INJECTION SOUS CUTANEE

Dans tous les cas nous avons utilisé une solution du $C Cl_4$ dans l'huile de tournesol. Les DL 50 par cette voie chez la souris et le rat sont de l'ordre de 30 et 20 grammes/Kg. Les critères de l'atteinte hépatique choisis ont été : les taux de lipides hépatiques, de la LDH et de l'OT sérique, de la SGOT, les tests d'épuration sanguine et d'élimination biliaire de la BSP.

Suivant l'expérimentation, tels ou tels de ces tests ont été retenus pour suivre l'évolution de l'atteinte hépatique.

1 - Atteinte hépatique chez la souris après une injection de tétrachlorure de carbone

Des souris mâles SWISS ont reçu par voie sous-cutanée 0,2 ml d'une solution huileuse de $C Cl_4$ à 25 mg/ml (soit 0,16 ml de $C Cl_4$ dans 10 ml d'huile de tournesol). Cette quantité, chez des souris de 20 grammes correspond à une dose de 250 mg/Kg.

A des temps déterminés après l'injection, des lots de 10 à 12 souris, prélevés au hasard, ont été soumis au test d'épuration sanguine de la BSP; parallèlement des dosages de lipides hépatiques, de LDH et d'OT sérique ont été effectués. Les résultats consignés dans le tableau suivant représentent les moyennes des valeurs sur environ 100 animaux.

TABLEAU XVIII

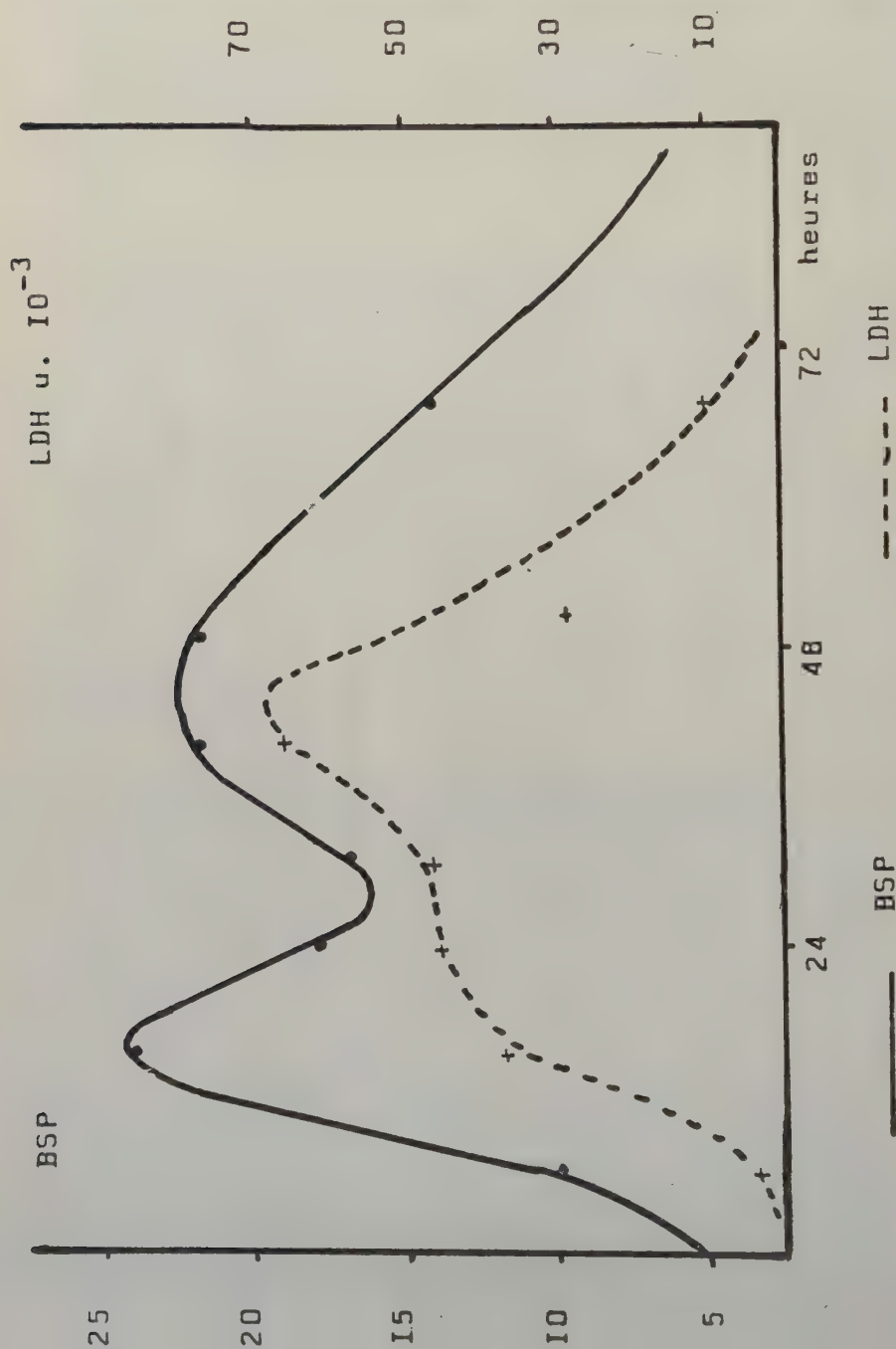
CINETIQUE DE L'ATTEINTE HEPATIQUE CHEZ LA SOURIS INTO-
XIQUEE AU TETRACHLORURE DE CARBONE (250 mg/KG - S.C.)

Variations en fonction du temps, de la rétention de BSP
 des taux de lipides hépatiques, de la LDH et de l'O C T
 sérique.

100 animaux	Témoins	6 heures	16 heures	24 heures	31 heures	40 heures	68 heures	96 heures
B S P	5,3	11	24 ± 8	18 ± 6,5	17 ± 6	22 ± 7	14	7
L D H × 10 ⁻³	2,9	3,8	38	45 ± 21	45	65 ± 24	8	5,5
LIP. HEP.	4,5	-	6,2	-	-	6,3	-	-
O C T	4,8	24	-	28 ± 9	-	38 ± 11	30	-

FIGURE 10

Variations en fonction du temps de la rétention de BSP et du taux de LDH sérique chez la souris intoxiquée au tétrachlorure de carbone (250 mg/Kg - s.c.)



2 - Atteinte hépatique chez le rat après une injection de C Cl₄

Il a été injecté à des rats par voie sous cutanée du tétrachlorure de carbone à la dose de 1,2 g/Kg, soit 0,4 ml par rat de 250 grammes d'une solution du toxique à 50 % (V/V) dans l'huile de tournesol.

Nous avons effectué chez ces animaux les tests d'épuration sanguine et d'élimination biliaire comme ils ont été décrits précédemment. Les résultats sont réunis dans les tableaux XIX et XX, la teneur du sérum en B S P une minute après l'injection étant considérée comme 100 % et les taux de B S P éliminés dans la bile étant exprimés en p. 100 de la quantité injectée (50 mg/Kg).

TABLEAU XIX

EPURATION SANGUINE DE LA B S P CHEZ LE RAT 24 HEURES APRES UNE INJECTION DE C Cl₄ (1,2 g/Kg - s.c.)

	TEMOINS ♂ * (25)	INTOXIQUES ♂ (10)	TEMOINS ♀ (12)	INTOXIQUES ♀ (11)
1 minute	100	100	100	100
4 minutes	45	55	47	62
10 minutes	19	36	20	40
20 minutes	10	24	12	30
30 minutes	7	19	8	22
60 minutes	2	16	3	19

* nombre d'animaux

TABEAU XX

ELIMINATION BILIAIRE DE LA B S P CHEZ LE RAT 24 HEURES
APRES UNE INJECTION DE C Cl₄ (1,2 g/Kg en s.c.)

	TEMOINS ♂ * (10)	INTOXIQUES ♂ (8)	TEMOINS ♀ (10)	INTOXIQUES ♀ (6)
15 minutes	25	15	30	5
30 minutes	52	35	62	11
45 minutes	68	45	76	17
60 minutes	74	48	83	25

* nombre d'animaux

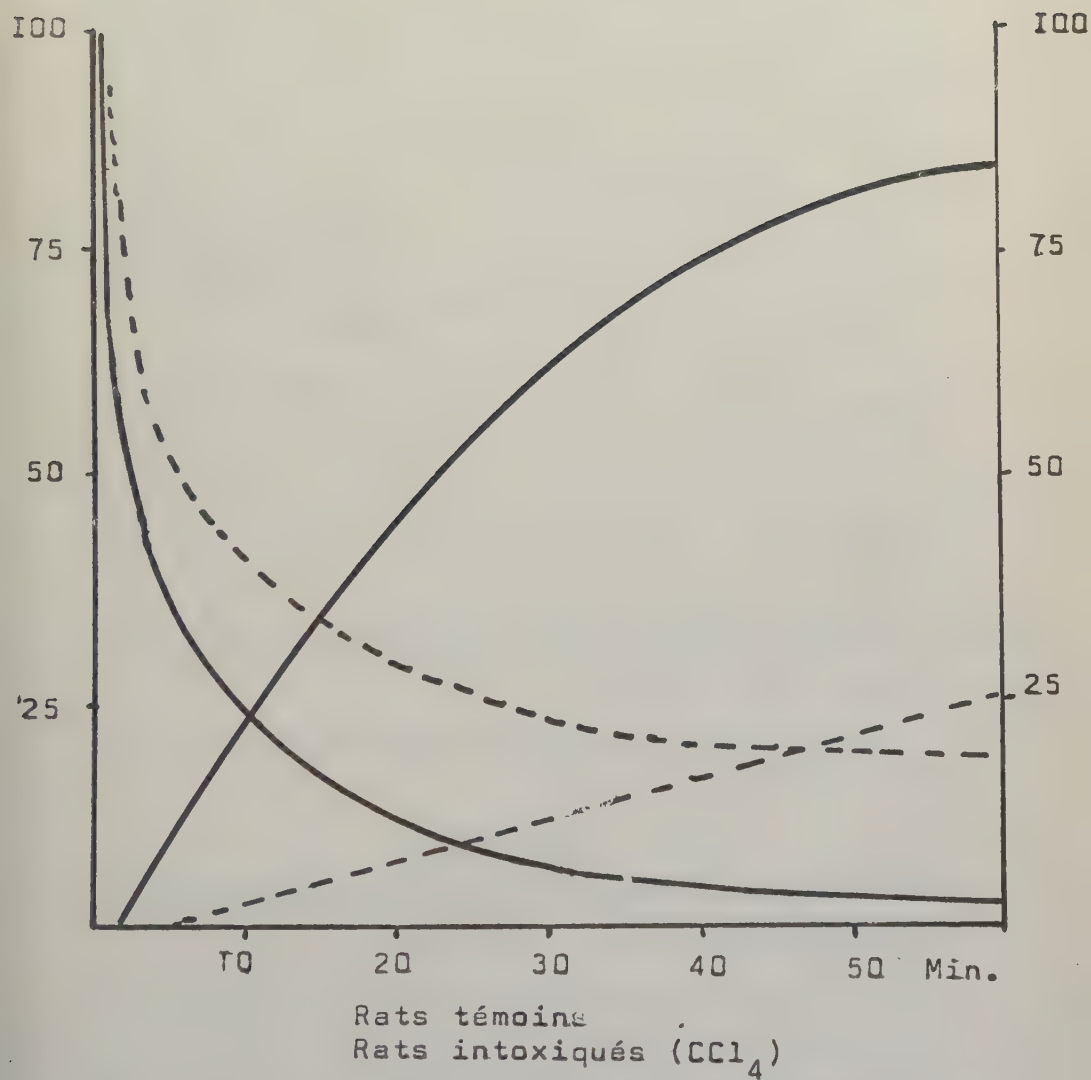
Nous avons en outre suivi dans le temps la restauration de la fonction chromagogue du foie chez des rats femelles intoxiquées au tétrachlorure de carbone 1,2 g/Kg en s.c.). Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant :

TABEAU XXI

RESTAURATION DE LA FONCTION CHROMAGOGUE DU FOIE CHEZ LE
RAT APRES INTOXICATION AU C Cl₄

	TEMOINS (20)*	24 heures (5)	3 jours (5)	6 jours (5)
15 minutes	30	5	10	20
30 minutes	62	11	25	50
45 minutes	76	16	45	68
60 minutes	83	25	58	79

* nombre d'animaux

FIGURE 11

B - INTOXICATION PAR INHALATION DE VAPEURS
DE TETRACHLORURE DE CARBONE

Il est certain que la meilleure voie pour administrer un produit quel qu'il soit est la voie intraveineuse. Comme d'autres auteurs nous avons essayé de créer des intoxications chroniques chez le rat ou la souris par voie sous cutanée. Cependant cette technique est non seulement fastidieuse mais elle conduit souvent à des foyers de nécrose aux points d'injection ce qui risque de perturber l'expérimentation. L'administration intraveineuse était exclue pour un tel agent mais par contre la voie respiratoire pouvait s'envisager dans certaines conditions expérimentales et nous avons effectué des essais dans ce sens chez le rat et la souris.

En utilisant l'appareillage et en tenant compte des données exposées plus haut, nous avons soumis des rats (300 g) et des souris (20-22 g) à des inhalations de C Cl_4 dont la concentration de la vapeur allait de 0,1 à 1 ‰. Les intoxications ont duré 15 heures et les prises de sang en vue d'un dosage de la S G O T pratiquées 2 heures après. Chez les rats nous avons seulement dosé la S G O T, tandis que chez les souris 50 % des animaux ont servi aux dosages des enzymes sériques (SGOT et L D H) et le reste a été soumis au test d'épuration sanguine de la B S P.

Dans les tableaux XXII et XXIII sont consignés les résultats obtenus.

TABEAU XXII

VARIATION DE LA TRANSAMINASEMIE CHEZ LE RAT SOUMIS A
UNE INHALATION DE C Cl_4 (15 heures)

150 animaux	Témoins	C Cl_4 0,1 ‰	C Cl_4 0,2 ‰	C Cl_4 0,5 ‰
S G O T u. Reitman Frankel	189 ± 36	305 ± 54	370 ± 70	550 ± 65

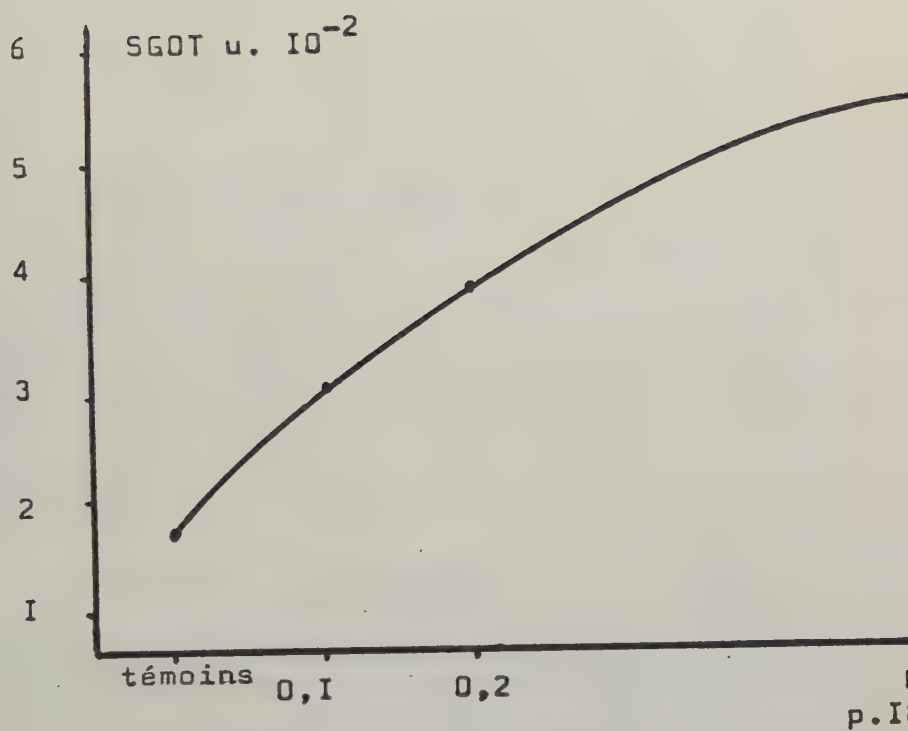
FIGURE 12

TABLEAU XXIII

VARIATION DES TESTS HEPATIQUES CHEZ LA SOURIS SOUMISE
A UNE INHALATION DE C Cl₄ (15 heures)

100 animaux	Témoins	C Cl ₄ 0,1 %	C Cl ₄ 0,5 %	C Cl ₄ 1 %
S G O T u. Reit. Frank.	250 ± 65	1050	1800	3400
L D H × 10 ⁻³	3,2 ± 0,45	9,5 ± 1,8	16,5 ± 4,2	23 ± 6,5
Rétention B S P	5,3 ± 0,5	15 ± 2,3	19 ± 1,8	24 ± 2,6

L'ensemble des résultats que nous venons de rapporter conduit aux conclusions suivantes :

- La souris est très sensible au tétrachlorure de carbone et les perturbations de l'épuration sanguine de la B S P précèdent nettement l'hyperenzymémie. Du reste la courbe représentant leur évolution (Figure 10, p.138) montre l'existence d'un pic pour la L D H sérique et de deux pics pour la B S P; le premier correspond vraisemblablement à une atteinte précoce de la perméabilité de la membrane, atteinte encore insuffisante pour libérer les enzymes.

- Les variations de l'épuration sanguine et de l'élimination biliaire de la B S P chez le rat montrent que chez cette espèce la femelle est beaucoup plus sensible que le mâle. La régénération amorcée le troisième jour est pratiquement totale au sixième.

- Les résultats consignés dans les tableaux font apparaître une certaine sensibilité et souplesse dans l'intoxication par voie pulmonaire. En jouant à la fois sur la concentration, la durée et la fréquence des expositions, il est possible de créer et d'entretenir une atteinte hépatique chronique chez le rat et la souris

HEPATITES A LA THIOACETAMIDE

Nous avons étudié chez la souris le syndrome de cytolyse et d'atteinte hépatique consécutive à une injection unique de thioacétamide et son évolution au cours d'une atteinte sub aigüe provoquée par le régime contenant ce toxique à une concentration de 0,1 et 0,005 %.

A - ATTEINTE HEPATIQUE PROVOQUEE PAR UNE INJECTION DE THIOACETAMIDE

Injectée par voie sous cutanée chez la souris, la thioacétamide a une D L₅₀ de 750 mg/Kg. Nous avons pratiqué sur une centaine de souris mâles de 20 g environ une injection de thioacétamide à la dose de 250 mg/Kg. A des temps déterminés, après l'injection, des animaux ont été prélevés sur lesquels ont été effectués le test à la B S P et le dosage de la LDH sérique.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau XXIV.

TABLEAU XXIV

ATTEINTE HEPATIQUE CHEZ LA SOURIS APRES UNE INJECTION DE THIOACETAMIDE

100 animaux	0	6 h.	12 h.	22 h.	29 h.	40 h.	52 h.	72 h.	96 h.
B S P	5,1	15 + 5,2	22 +6	17 +4	18 +5,3	25 +7,2	22 +4,2	14	7
L D H x 10 ⁻³	2,7	4,5	4,7	25 + 7	65 +18	37 +11	30 +12	12	7

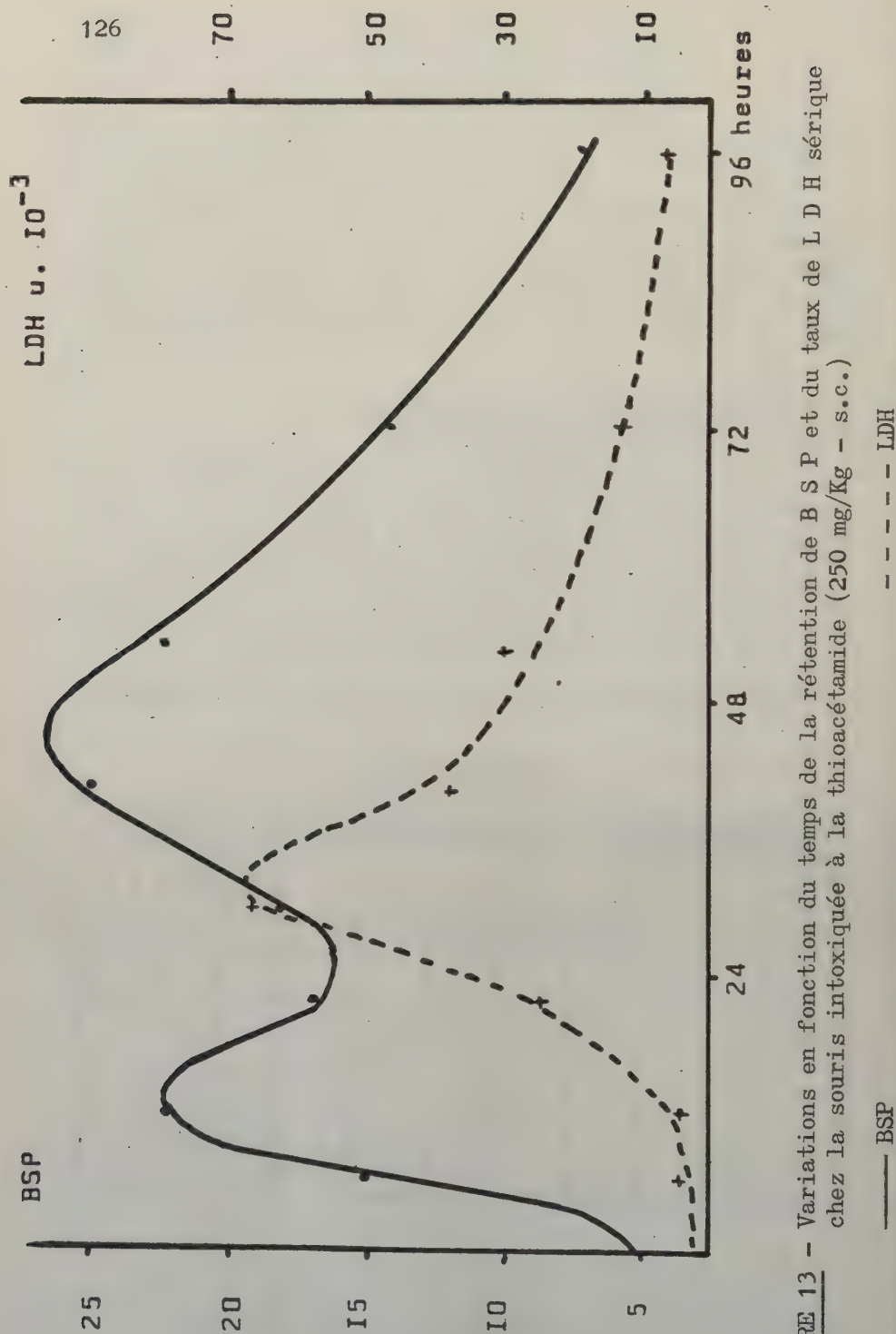


FIGURE 13 - Variations en fonction du temps de la rétention de B S P et du taux de L D H sérique chez la souris intoxiquée à la thioacétamide (250 mg/Kg - s.c.)

— BSP
- - - - LDH

B - ATTEINTE HEPATIQUE PROVOQUEE PAR L'ADMINISTRATION
DE THIOACETAMIDE INCORPOREE DANS LE REGIME

Des souris mâles SWISS de 22 grammes environ ont été soumises à un régime contenant 0,1 % de toxique.

Le test à la B S P et le dosage de la L D H sérique a été régulièrement pratiqués. Les résultats consignés dans le tableau suivant portent sur 100 animaux et montrent l'importance de l'atteinte hépatique dont la conséquence la plus visible est la perte de poids des animaux (6 g.) et une mortalité nette importante des animaux intoxiqués à la fin de l'expérimentation.

TABLEAU XXV

VARIATIONS DU TEST A LA B S P ET DU TAUX DE L D H SÉRIQUE CHEZ LA SOURIS SOUMISE A UN REGIME CONTENANT 0,1% DE THIOACETAMIDE

100 animaux	0	2	4	5	6	7	8	9
B S P	5,3	6	9	11	14	16	19	24
L D H × 10 ⁻³	3,8	-	7,5	-	8,2	-	6,5	-

Il ressort de ces résultats que le toxique a été utilisé à une dose trop élevée et que les variations du taux de L D H sérique sont relativement peu importantes.

Nous avons donc été amenés à reprendre cette expérimentation avec un régime contenant deux fois moins de thioacétamide (0,05 %) et en effectuant parallèlement au test à la B S P le dosage de l'O C T sérique, enzyme dont l'origine est plus spécifiquement hépatique. Les résultats obtenus dans cet essai portant sur environ cent animaux sont réunis dans le tableau XXVI (p.129).

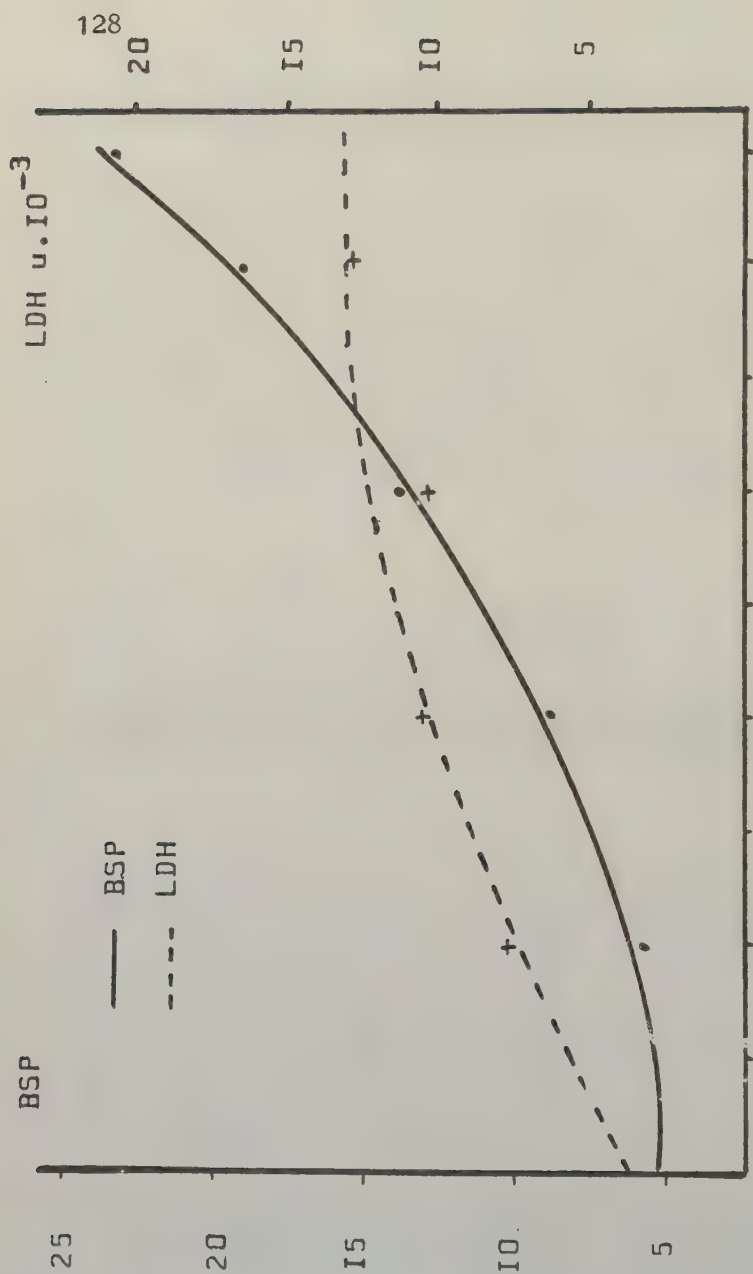


FIGURE 14 - Variations de la rétention de B S P et du taux de la L D H sérique chez la souris mâle soumise à un régime à la thioacétamide (0,1 %)

TABLEAU XXVI

ATTEINTE HEPATIQUE CHEZ LA SOURIS SOUMISE A UN REGIME
DE 0,05 % DE THIOACETAMIDE

60 animaux	Témoins	3 jours	7 jours	10 jours	15 jours	24 jours
B S P	5,3	5,5	8,2	16	17	19
L D H 10 ⁻³ u	3,8	-	-	7,5	9,1	8,8
O C T	4,8 ±2,7	-	20 ± 7	44 ±16	63 ± 21	59 ±23

A partir de ces résultats, nous pensons pouvoir préconiser l'emploi de la thioacétamide sous forme de régime à 0,05 % chez la souris. Celle-ci développe en deux à trois semaines une atteinte hépatique très nettement objectivée par les différents tests envisagés.

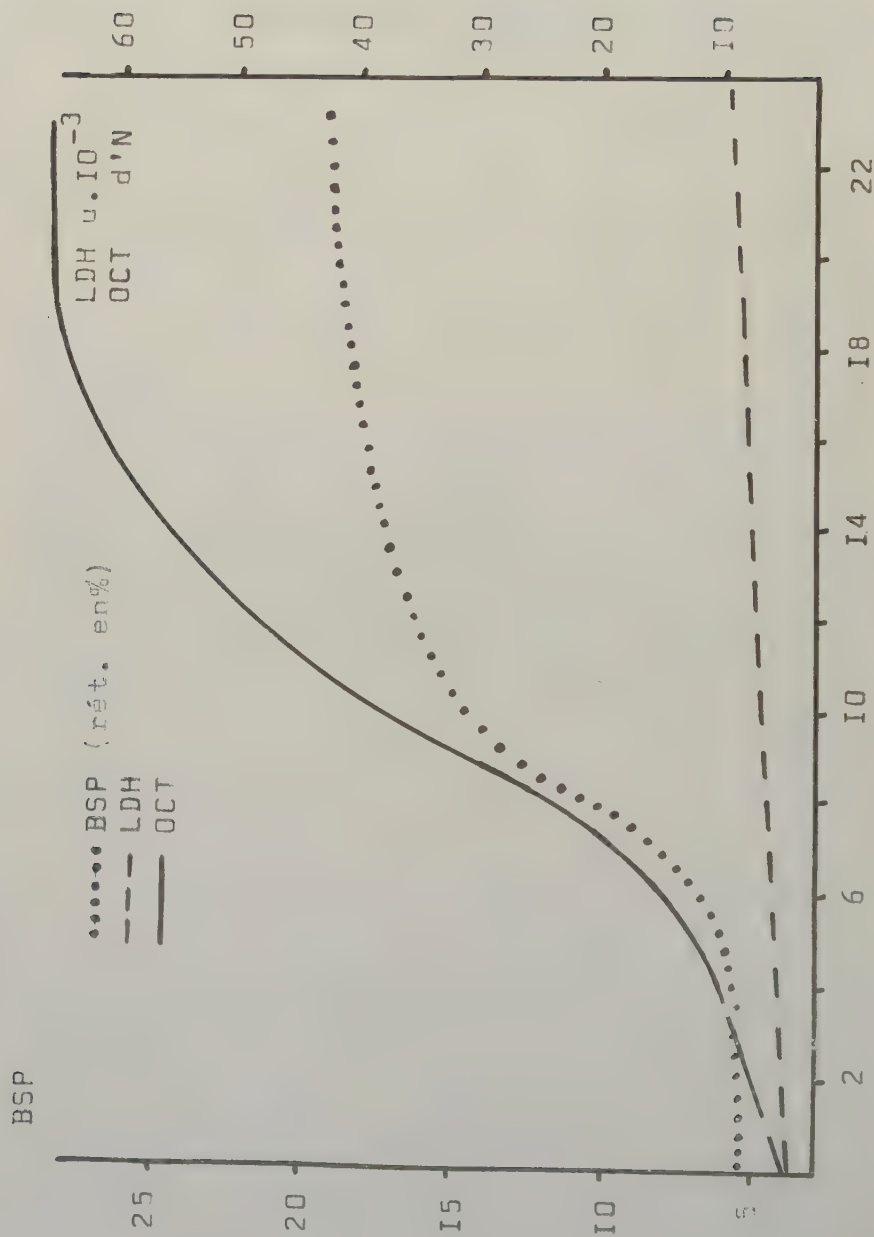


FIGURE 15 - Variation de la rétention de BSP et des taux de LDH et OCT sérique chez la souris mâle soumise à la léion à l'acétamide (0.05 %)

STEATOSE AU PHOSPHORE

La toxicité du phosphore est connue depuis longtemps et principalement son pouvoir stéatosant.

Nous avons utilisé, pour étudier cet effet, une solution huileuse de phosphore blanc à 1 %. Cette solution était diluée extemporanément au moment de l'emploi.

L'étude a porté sur la souris et le rat.

1 - Atteinte hépatique chez la souris provoquée par une injection de phosphore

Des lots de souris mâles de 20-22 grammes ont reçu par voie i.m. ou i.p. différentes doses de phosphore et 2 - 4 jours après il a été procédé au dosage des lipides hépatiques et de la L D H sérique.

Les résultats trouvés sont réunis dans le tableau XXVII.

TABLEAU XXVII

ATTEINTE HEPATIQUE CHEZ LA SOURIS INTOXIQUEE AU PHOSPHORE BLANC

nombre d'animaux	Dose mg / Kg	Voie	Durée de l'intox.	Mortalité en %	Lip. Hep.	L D H $\times 10^{-3}$
10	25	I.M.	12 h.	50	5,3	2,5
20	10	I.M.	2 j.	10	5,1	3,1
15	5	I.M.	2 j.	0	4,6	4,1
10	5	I.P.	2 j.	0	6,5 $\pm 2,2$	4,3 $\pm 1,8$
10	5	I.P.	4 j.	0	5,8 ± 2	6,5 $\pm 3,1$
10	Témoins	-	-	-	4,5	2,3

Ces résultats sont éloquentes. Ils montrent que même à des doses élevées, létales, une injection de phosphore chez la souris ne provoque pas d'atteinte hépatique significative.

2 - Atteinte hépatique chez le rat provoquée par une injection de phosphore blanc

Des rats mâles de 300 grammes environ reçurent 0,15 ml d'huile phosphorée à 1 % par voie intrapéritonéale. Le test d'élimination biliaire de la B S P fut pratiqué et les lipides hépatiques dosés 4 jours après l'injection du toxique. Chez cinq animaux nous avons, entre temps (2 jours après l'huile phosphorée), injecté par voie intraveineuse du Triton (WR 1339) * en solution à 4 % à raison de 200 mg/Kg pour augmenter les lipides circulant. A cette dose, le triton fait monter chez le rat, en 20 heures, la lipémie de 5 à 40 grammes par litre avec retour à la normale après trois jours.

Les résultats sont consignés dans le tableau XXVIII.

* Le Triton est un polymère du p. isoocetyl polyoxyéthylène phénol.

TABLEAU XXVIIIINTOXICATION PHOSPHOREE CHEZ LE RAT

Variation des taux de L D H et du test d'élimination biliaire de la B S P.

N°	Produits administrés	Durée de l'intoxication	Lipides Hépat.	B S P en % après 1 heure
Témoins (15)	-	-	4,4 + 0,6	78 ± 9
1	H. Phosphorée	4 jours	6,3	65
2	H. Phosphorée	"	13,2	45
3	H. Phosphorée	"	12	28
4	H. Phosphorée	"	6,8	51
5	H. Phosphorée	"	9,8	-
Témoins (4)	Triton	2 jours	4,1	73
6	H. Phosphorée + Triton	4 jours	13,5	43
7	H. Phosphorée + Triton	"	12,8	31
8	H. Phosphorée + Triton	"	15,7	28
9	H. Phosphorée + Triton	"	11,3	58
10	H. Phosphorée + Triton	"	Mort	-

A la vue de ces résultats on peut remarquer que les effets stéatosants du phosphore blanc, meilleurs chez le rat que chez la souris sont toutefois inconstants et, seules les B S P tendent, dans les conditions expérimentales, à objectiver l'hépatotoxicité du phosphore.

En raison de la dispersion des résultats, nous n'avons pas cru pouvoir retenir l'intoxication au phosphore dans le protocole final.

INTOXICATION AU BROMOBENZENE

Nous avons injecté à des lots de souris mâles de 20 grammes du bromobenzène à raison de 500 mg/Kg par voie sous cutanée. Une mesure préalable de la D L 50 par cette même voie nous avait donné 700 mg/Kg. A différents temps après l'injection nous avons pratiqué sur ces animaux le test de la B S P et le dosage de la L D H sérique.

Les résultats obtenus (Tableau XXIX) montrent que le bromobenzène dans ces conditions expérimentales ne présente pas chez la souris une hépatotoxicité aussi spécifique que celle du tétrachlorure ou de la thioacétamide compte tenu de la dose qu'il est nécessaire d'injecter ($> D M T$) pour obtenir les variations consignées dans le tableau.

TABLEAU XXIX

INTOXICATION AU BROMOBENZENE CHEZ LA SOURIS

Variations de la L D H sérique et de la rétention de la B S P

	Témoins	6 h.	12 h.	18 h.	24 h.	38 h.	48 h.	52 h.
B S P	5,1	8	11	13	16	17	11	10
L D H $\times 10^{-3}$	2,7	4,5	13	18	23	25	10	2,8

Pour comparer encore plus précisément l'hépatotoxicité du bromobenzène avec celle du tétrachlorure de carbone chez la souris, nous avons soumis cette dernière

à l'inhalation du toxique à la concentration de 1 ‰ pendant 15 heures. Les résultats obtenus contenus dans le tableau suivant montrent que le bromobenzène est loin d'avoir une toxicité aussi spécifique que le tétrachlorure de carbone. Il est à noter cependant qu'à la fin de cet essai qui a porté sur 25 animaux mâles, ceux-ci étaient assez atteints sur le plan général (hypothermie, atonie).

TABLEAU XXX

Variations des taux de S G O T et
de L D H sériques et de la rétention
de B S P chez la souris soumise à
une inhalation de bromobenzène
 (0,1 p. 1000 - 15 heures)

25 animaux	Témoins	C_6H_5Br 0,1 p. 1000
S G O T	250	303
L D H u. 10^{-3}	3,2	4,1
B S P	5,3	10,8

INTOXICATION A L'ALCOOL ALLYLIQUE

Comme dans le cas du bromobenzène, nous avons voulu préciser si l'alcool allylique, retenu par certains auteurs (193) (80) (148), était un toxique hépatique éventuellement utilisable dans un test de triage. Nous avons donc comme précédemment, chez la souris, étudié les variations du taux de la L D H sérique et de la rétention de B S P après injection par voie sous cutanée de 40 mg par Kilog d'alcool allylique. La D L 50 de ce toxique par la même voie chez le même animal est de 58 mg/Kg. Les résultats rapportés dans le tableau XXXI montrent que, dans ces conditions expérimentales, l'atteinte hépatique objectivée par les tests biochimiques adoptés n'est pas très significative.

TABLEAU XXXI

	Témoins	20 heures	46 heures	72 heures
B S P	5,1	8	10	8
L D H × 10 ⁻³	2,7	4,8	5,8	5

INTOXICATION CHRONIQUE

A L'ALCOOL ETHYLIQUE

Compte tenu des données divergentes de la littérature concernant la création éventuelle d'une hépatite alcoolique chronique chez le rat, nous avons soumis un lot de 50 animaux femelles à une imbibition alcoolique à 25 degrés. Cette concentration a été obtenue progressivement en 5 mois et maintenue 14 mois. Nous avons parallèlement gardé un lot témoin de 50 animaux du même âge et provenant du même éleveur.

Nous avons effectué sur ces animaux régulièrement des dosage de S G O T et sur certains, sacrifiés, des dosages de lipides hépatiques. Aucune atteinte sur le plan biochimique n'a été statistiquement décelée. Au contraire la mortalité chez les animaux témoins, après un an, a été nettement supérieure à celle des intoxiqués. Cependant nous avons noté un amaigrissement et lors de très chaudes journées de l'été où la température de l'animalerie avait atteint 35° un accroissement très important de la léthalité des animaux "alcooliques". Les dosages des lipides hépatiques alors effectués ont montré une stéatose assez nette confirmée, du reste, par les résultats histologiques consignés ci-après.

RESULTATS HISTOLOGIQUES *

Une étude histologique a été faite sur des échantillons de tissu hépatique lors de différentes expérimentations. Les résultats ne correspondent pas à un aussi grand nombre d'animaux que ceux exprimés précédemment mais ils permettent cependant de compléter ces derniers.

1 - Régime hyperlipidique hypoprotéique

Souris mâles - 10 jours

En général sur tous les échantillons : aspect clair et ballonnisation des hépatocytes dans chacun des lobules.

2 - Régime éthionine 0,3 %

Souris mâles - 3 et 5 jours

Architecture conservée. Intégrité des hépatocytes. Présence d'assez nombreux nodules inflammatoires de taille parfois importante. Infiltration lymphoplasmocytaire des espaces de Kiernan.

3 - Thioacétamide : 500 mg/Kg i.p.

Souris mâles - 20 heures

Pas de modifications de l'architecture lobulée. Conservation de la disposition trabéculée. Aspect clair des cytoplasmes des hépatocytes des régions periportales. Discrète infiltration lymphoplasmocytaire de certains espaces portes.

*

Nous remercions chaleureusement le Médecin-Colonel MAITRE, chef du Laboratoire d'anatomie pathologique de l'Hôpital militaire DESGNETTES d'avoir bien voulu effectuer pour nous l'étude histologique de divers échantillons prélevés au cours de nos essais.

4 - Thioacétamide (Régime 0,1 %) - Souris mâles

- 4 jours : R.A.S.
- 6 jours : R.A.S.
- 8 jours : on note au niveau des zones périportales une mince bande avec vasodilatation des capillaires sinusoides et nécrose acidophile des hépatocytes; dans le reste des lobules : aspect clair des cytoplasmes et ballonnisation des hépatocytes.

5 - Bromobenzène (injections par voie sous cutanée)

- Souris, 200 mg/Kg, 24 heures : Tantôt aspect clair et ballonnisation des hépatocytes avec tendance à la nécrose acidophile: tantôt ballonnisation des hépatocytes généralisée dans tous les lobules.
- Souris, 750 mg/Kg, 24 heures : Dans certains foies : R.A.S. Dans d'autres on note une importante vasodilatation. Parfois il existe en outre une nécrose acidophile de certains hépatocytes de la zone centrolobulaire.
- Souris, 750 mg/Kg, 48 heures : Nécrose acidophile de nombreux hépatocytes des régions péri et centrolobulaires.

6 - Alcool éthylique

Intoxication chronique de rats femelles; résultats après 15 mois : Peu de modifications en dehors d'une discrète stéatose périportale.

Chez certains animaux : architecture lobulée et trabiculée conservées mais existence d'une stéatose notable (30 %) au niveau de la zone périportale.

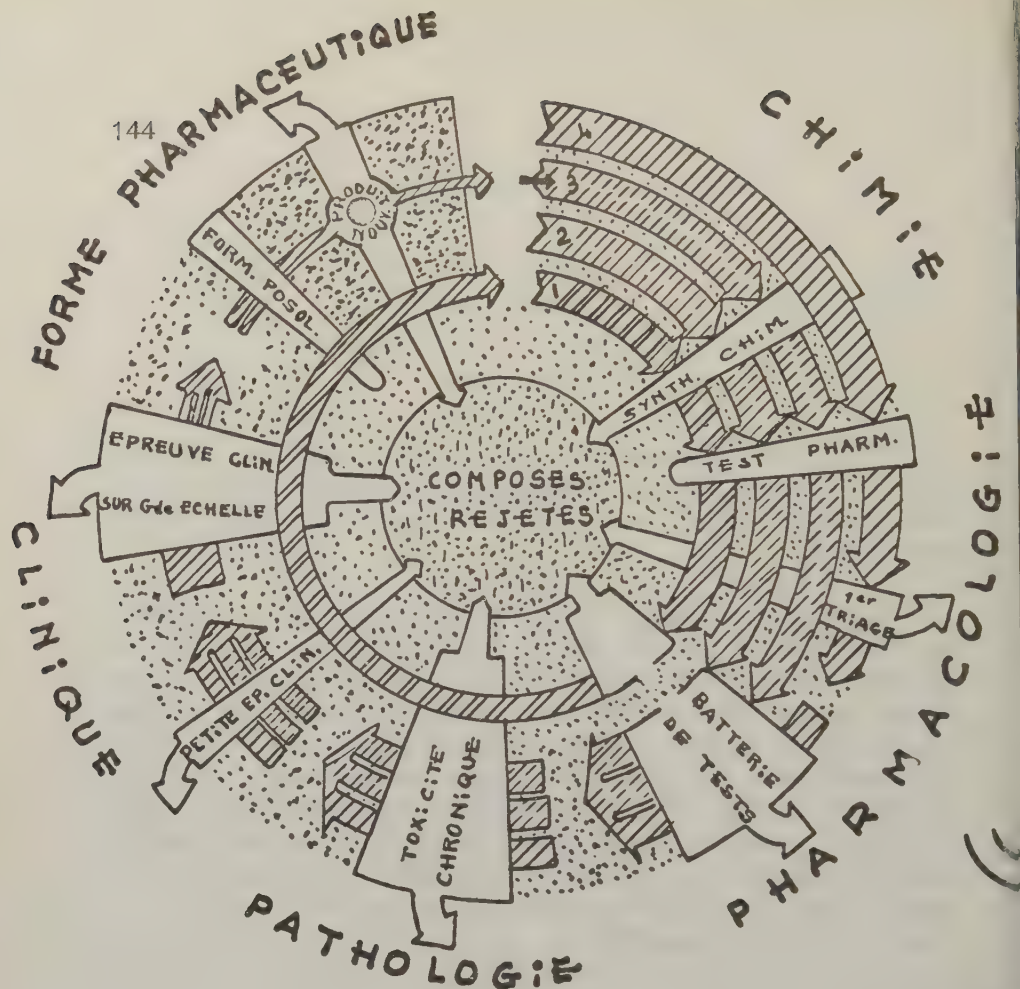
DISCUSSION DES RESULTATS

PROTOCOLE PROPOSE

Dans la recherche d'un médicament nouveau, les essais pharmacologiques de triage représentent une étape essentielle, destinée en premier lieu à orienter les synthèses.

Le schéma suivant (figure 16) emprunté à LAURENCE et BACHARACH (*) rend compte des principaux stades qui précèdent la naissance d'un agent thérapeutique. On voit ainsi toute l'importance que revêt le triage préalable de molécules qu'elles soient entièrement nouvelles ou apparentées à d'autres déjà commercialisées. Un tri trop grossier risque de faire éliminer une substance active; un filet à mailles trop fines ferait retenir inutilement des substances sans intérêt, alourdissant encore des essais dont le schéma ne met pas en évidence la complexité et la durée.

(*) LAURENCE D.R. BACHARACH A.L. Evaluation of drug activities - P. 34. Academic Press (London and New-York) 1964.



effets
inattendus

- 1) Recherche systématique dans une série chimique nouvelle
- 2) Drogues naturelles
- 3) Recherche de nouveaux médicaments à partir d'un modèle déjà consacré en thérapeutique
- 4) Recherches dues au hasard

FIGURE 16

ETAPES PREALABLES A LA NAISSANCE D'UN MEDICAMENT

Nous avons rapporté les techniques expérimentales adoptées chez la souris et le rat pour provoquer une hépatite toxique ou nutritionnelle et suivre son évolution. Nous ne prétendons pas avoir étudié tous les aspects du problème mais compte tenu du nombre des protocoles qui peuvent être envisagés tant pour créer que pour évaluer l'atteinte hépatique, un choix s'imposait au départ et notre principal objectif fut de rechercher parmi les tests aisés à mettre en oeuvre ceux qui permettraient néanmoins valablement l'étude d'une série chimique.

A la lumière de nos résultats, nous allons passer en revue les caractéristiques qu'implique un tel protocole.

I -- SIMPLICITE DES TECHNIQUES

Elle s'impose sur trois plans différents :

- le choix des espèces animales
- " " agents et moyens
- " " critères

Parmi les animaux de laboratoire, notre choix s'est porté évidemment sur le rat ou la souris et plus particulièrement sur cette dernière. Depuis quelques années les microdosages biochimiques font de plus en plus de la souris l'animal le plus intéressant pour une expérimentation pharmacologique. L'intérêt de son emploi est évident : animal de très petite taille, elle demande peu de place et son prix de revient permet de l'utiliser à une assez grande échelle et d'obtenir des résultats statistiquement exploitables correspondant à des moyennes de plusieurs dizaines d'animaux.

Le choix des agents et moyens, but de notre travail, aura une importance capitale si l'on veut envisager un protocole à la fois simple et reproductible.

Aussi avons-nous veillé à ce que la composition des régimes ou l'administration de tel ou tel toxique soit aisée au possible (inhalation, incorporation dans le régime). Il est évident que des injections quotidiennes chez un grand nombre d'animaux est incompatible avec la simplicité que doit revêtir un test de triage. D'ailleurs, contrairement à quelques auteurs, nous pensons que l'ingestion régulière d'un toxique incorporé à la ration offre, avec un nombre suffisant d'animaux, une homogénéité satisfaisante dans les résultats.

Le second problème, objectiver l'atteinte fonctionnelle, a été résolu à l'aide de tests choisis également en fonction de leur simplicité. Etant donné l'emploi préférentiel que nous faisons de la souris, animal dont la masse sanguine ne dépasse pas 1,5 ml, les déterminations d'enzymémies se sont imposées, d'autant plus que le sérum de ces animaux en renferme en général de fortes concentrations. D'autre part, le test d'épuration sanguine de la B S P, pratiqué très aisément selon le protocole décrit donne des renseignements très appréciables sur la masse fonctionnelle globale du foie. En ce qui concerne le dosage des lipides hépatiques, la technique colorimétrique préconisée par SCHMIT, permet de faire de cette détermination un acte de routine, ne demandant que peu de temps et de matériel.

Ainsi, nous pensons, sous les trois points retenus, avoir répondu à cet impératif d'une étude de triage qui est la simplicité des techniques envisagées.

II - RAPIDITE D'EXECUTION

Un "screening" exige des réponses rapides (*). Si l'on tient compte des délais nécessités par les contrôles analytiques et les mesures préalables de toxicité, l'épreuve de triage ne doit pas demander plus de un à

(*)

Il faut noter que les relations entre le pharmacologue et l'organicien s'imposent à l'occasion de l'étude d'une série chimique, et il n'est pas évident que des résultats négatifs soient par là même dénués d'intérêt.

deux mois au maximum. Il importe donc de mettre au point des techniques rapides excluant tout protocole de longue durée dans la création des atteintes ainsi que toute étude histologique dans leur évaluation.

De ce fait il a fallu ainsi choisir des animaux à métabolisme rapide; le rat et plus encore la souris répondaient parfaitement à cette exigence.

III - SENSIBILITE ET SIGNIFICATION DES PROTOCOLES

De tels essais doivent avoir pour objet de créer des diathèses expérimentales dont il est possible de suivre l'évolution et qui n'aboutissent pas d'emblée à un stade correspondant à des lésions irréversibles, telles qu'aucune activité protectrice ne puisse être décelée. Il importe aussi de pouvoir évaluer et si possible chiffrer le degré de l'atteinte fonctionnelle. Ces caractéristiques sont fonction de trois paramètres qu'il faut toujours avoir à l'esprit :

Tout d'abord, la technique adoptée doit être reproductible, c'est-à-dire que, répétée à tout moment dans les mêmes conditions expérimentales, elle doit aboutir à un même état pathologique. Ceci dépend en grande partie des animaux.

La variance liée à l'utilisation d'un tel "matériel" représente le second paramètre; il est de loin le plus important et conditionne pratiquement à lui tout seul la réussite ou l'échec de l'expérimentation. Ce facteur revêt de multiples aspects et peut être grossièrement divisé en paramètres internes et externes. Les premiers correspondent à l'espèce et à la souche de l'animal, son âge, son sexe et prennent chacun une plus ou moins grande importance lors de la création des différents types d'hépatite. Les seconds correspondent notamment aux influences de la saison, la température et l'humidité de l'animalerie, la nourriture et aussi à l'"état social" des sujets, c'est-à-dire leur espace vital, les changements de cages, les groupages d'animaux... L'état sanitaire de l'élevage est en outre un

problème capital qui se pose à l'expérimentateur comme dans le cas de tous les essais d'une durée aussi prolongée. (*) Si les souris proviennent d'un élevage extérieur, il faut les sérier selon un critère pondéral et constituer des lots homogènes ($\pm 0,5$ gramme); il importe aussi de suivre, toujours pondéralement, les souris une à deux fois par semaine pendant deux à trois semaines; tout animal présentant des signes d'amaigrissement ou d'ectromélie (**) sera rejeté et sacrifié.

Le nombre d'animaux à utiliser pour un essai doit être déterminé compte tenu pour chacun des tests biologiques adoptés, des écarts "normaux" et pathologiques, ces derniers étant eux-mêmes fonction de la sensibilité de la souche animale au mode d'intoxication hépatique qui a été choisi. Ces deux facteurs de variation nous ont amenés à préciser dans le protocole proposé plus loin le nombre d'animaux nécessaires pour chaque essai.

Le troisième paramètre dont dépend la valeur de l'expérimentation correspond aux critères adoptés pour tenter d'évaluer l'atteinte fonctionnelle et l'activité éventuelle d'un agent hépatoprotecteur. Nous avons déjà indiqué que leur choix était guidé par la simplicité et la rapidité. Mais, bien que ces deux qualités soient nécessaires il est évident, qu'avant tout, les tests retenus doivent être significatifs. Cette question a été discutée pour chacun d'entre eux mais nous n'avons pas cru dénué d'intérêt de présenter dans un même tableau (XXXII) les interprétations qu'il est possible d'en tirer. Bien que l'éventail qu'ils représentent soit relativement ouvert sinon complet, nous ne devons pas mésestimer cependant les lacunes que possède notre protocole d'exploration fonctionnelle, mais il s'agit, nous

(*) Au cours d'essais portant éventuellement sur plusieurs semaines on ne peut négliger le risque de voir se développer des affections intercurrentes. On utilise toujours de préférence un grand nombre de petites cages avec dix animaux au maximum par cage. (cages pleines avec copeaux renouvelés deux fois par semaine).

(**) L'ectromélie est une affection virale, très fréquente chez la souris, s'apparentant à la variole humaine. Elle se manifeste par des ulcérations à la queue et aux pattes. Dès qu'un animal présente ce symptôme, sacrifier le lot et désinfecter la cage.

le répétons, d'un test de "screening" et il faut bien décider arbitrairement de la largeur à adopter pour les mailles du filet que nous tendons au produit doué d'une activité hépatotrope éventuelle.

TABLEAU XXXII

		Atteinte de la membrane cell.	Stéatose	Cytolyse Nécrose	Cirrhose
LIP. HEP.		-	+++	+ -	-
ENZYMES SERIQUES	S G O T L D H	+	+ -	++++	+
	O C T	+	++	++++	+++
EPURATION DE LA B S P		++	++	+++	+++

Grâce aux microméthodes utilisées, un petit animal tel que la souris permet à lui seul de fournir un tableau "clinique" suffisamment abondant. En effet la prise de sang intra-cardiaque ou plus simplement la décapitation, fournissent aisément 0,4 ml de sérum. Les techniques de dosages enzymatiques au D P N H ne sont pas perturbées par la présence de B S P dans le sérum; on peut donc pratiquer les deux tests simultanément sur le même échantillon. D'autre part la sensibilité de la réaction sulfophosphovanillique permet une détermination assez précise de la teneur en lipides d'une petite fraction de foie de souris, permettant ainsi d'en conserver une partie pour des examens histologiques. Nous pensons qu'il vaut mieux, dans le cas d'une étude cinétique, faire le maximum de dosages sur une partie aliquote des animaux pris au hasard et sacrifiés au moment du prélèvement que

de limiter les tests sur chaque animal en effectuant des prélèvements de sang répétés à plusieurs jours d'intervalle; une prise de sang, même faible (0,4 ml), chez un animal comme la souris crée un choc qui est souvent fatal lors d'une hépatite expérimentale.

Dans l'ensemble il ressort de tous les résultats obtenus que la souris est un animal très valable pour un test de triage de substances hépatoprotectrices. Il nous est difficile de hiérarchiser les diverses modalités d'obtention de telle ou telle atteinte. Les régimes hyperlipidiques et hypoprotéiques créent des lésions par déséquilibre et surtout par carence, ce qui les rapprocherait de celles obtenues avec l'éthionine. Par contre, l'intoxication à la thioacétamide représente un phénomène actif atteignant directement la cellule hépatique au niveau de la synthèse protéique par destruction des systèmes enzymatiques producteurs d'énergie. Quant au tétrachlorure de carbone, son tropisme est multiple et c'est pourquoi, manié judicieusement, il représente toujours le toxique hépatique type.

Un dernier problème est posé par l'administration du produit à tester. Il porte entre autres, sur la posologie, la voie d'introduction et le moment où doit commencer le traitement au cours de l'évolution de l'atteinte.

- La dose : Elle dépend du produit (solubilité, pH) de la voie d'administration choisie, et de la D L₅₀ par cette voie. (*)

- La voie d'administration : Celle-ci est laissée à l'initiative de l'expérimentateur. Cependant en raison du nombre d'injections nécessaires la voie intraveineuse est exclue a priori. En toute logique il faudrait

(*) Plus encore que la D L₅₀, c'est l'allure plus ou moins aplatie de la courbe de toxicité qui renseignera sur la dose à administrer.

choisir la voie par laquelle sera administrée la substance en thérapeutique ; si le produit peut être donné per os, il sera incorporé dans le régime en tenant compte de la ration journalière moyenne; pour la souris une concentration de 0,5 % correspond environ à l'administration de 1 gramme par kilog d'animal. Cependant si le produit incorporé au régime modifie la prise alimentaire, il est évident qu'il faut alors recourir soit au tubage gastrique, soit à la voie intrapéritonéale.

- Plus que sur la fréquence d'administration, les auteurs sont loin d'être toujours d'accord sur le stade de l'expérimentation auquel doit débiter le traitement. On sait qu'en pharmacologie il est en général plus aisé de mettre en évidence une action préventive que de démontrer un effet curatif; si l'on a déjà une certaine variance dans la création de l'atteinte, celle-ci devient très importante au stade de la récupération. Aussi préconisons-nous de commencer à traiter les animaux en expérience trois à quatre jours avant une intoxication aiguë et dans le cas d'un régime carencé ou toxique si le produit n'y est pas déjà incorporé, d'administrer ce dernier dès le premier jour de l'essai ($j = 0$).

P R O T O C O L E

P R O P O S E

Etant donnés les résultats obtenus au cours de quatre années d'expérimentation nous avons été amenés à proposer un protocole de triage. Celui-ci a été testé sur différents composés commercialisés ou en voie de l'être. Les données positives ont été obtenues pour les différents produits sur un ou deux tests du protocole mais jamais sur tous ce qui implique donc de tous les pratiquer car il semble difficile de les hiérarchiser.

A - ESSAIS PRATIQUES CHEZ LA SOURIS

1 - Régime hyperlipidique et hypoprotéique

Employer le régime 3 A dont la composition a été donnée. Si les animaux présentent une trop faible appétence on peut remplacer les 3 % de caséine par 18-20 % de provende en poudre. (*)

<u>Exemple</u> :	Provende	20
	Lipides	50
	Fécule	) 25
	Saccharose	
	Sels	5

- Souris mâles de 20-22 grammes

- Répartir en 3 lots :

1. lot témoin 40 animaux
2. lot intoxiqué témoin : 90 animaux
3. lot intoxiqué et traité : 90 animaux

Planification de l'essai

	Jour 0	Jour 4	Jour 8	Jour 12
Témoins	10	10	10	10
Intoxiqués	-	30	30	30
Traités	-	30	30	30

Le produit essayé peut-être injecté quotidiennement ou incorporé au régime.

Il est nécessaire de vérifier le poids des animaux pendant et à la fin de l'essai ainsi que la prise de nourriture.

Tests à pratiquer : a) lipides hépatiques

b) épuration sanguine de la B S P

(*) Provende "Ratigène" A.E.C. Commentry (Allier)

2 - Régime à l'éthionine

Préparer avec de la provende en poudre un régime à 0,3 % de - D L éthionine qui devra se présenter sous forme de grosses croquettes. Celles-ci, après avoir été pesées, seront suspendues dans les cages. Ce qui permet de vérifier exactement la prise de nourriture.

- Souris mâles de 19-21 grammes

- Répartir en 3 lots :

1. lot témoin : 30 animaux
2. lot intoxiqué témoin : 60 animaux
3. lot intoxiqué et traité : 60 animaux

Planification de l'essai

	Jour 0	Jour 4	Jour 8
Témoins	10	10	10
Intoxiqués	-	30	30
Traités	-	30	30

Tests à pratiquer :

- a) Lipides hépatiques
 - b) Epuration sanguine de la B S P
 - c) Dosage de l'O C T sérique
-

3 - Régime à la thioacétamide

Les régimes sont préparés comme précédemment. Nous préconisons une teneur de 0,05 % de thioacétamide qui demande un délai suffisant pour créer une atteinte hépatique.

- Souris mâles de 20-22 grammes

- Répartir en 3 lots :

- 1. lot témoin : 50 animaux
- 2. lot intoxiqué témoin : 120 animaux
- 3. lot intoxiqué et traité : 120 animaux

Planification de l'essai

	Jour 0	Jour 6	Jour 10	Jour 15	Jour 20
Témoins	10	10	10	10	10
Intoxiqués	-	30	30	30	30
Traités	-	30	30	30	30

Le produit testé sera soit injecté quotidiennement soit incorporé au régime.

Tests à pratiquer :

- a) Epuration sanguine de la B S P
- b) Dosage de la L D H sérique
- c) Dosage de l'O C T sérique

5 -- Intoxication au tétrachlorure de carbone

Intoxication par injection unique de 250 mg de C Cl_4 par voie sous cutanée.

Répartir les animaux en 3 lots :

1. Lot témoin : 20 animaux
2. Lot intoxiqué témoin : 60 animaux
3. Lot intoxiqué et traité: 60 animaux

Les animaux sont sacrifiés et les tests pratiqués 24 et 48 heures après l'injection.

Planification de l'essai

	24 h.	48 h.
Témoins	10	10
Intoxiqués	30	30
Traités	30	30

Le produit essayé sera injecté en préventif 4, 3, 2 et 1 jour avant l'intoxication. Après administration du toxique le produit sera à nouveau administré deux fois par jour.

Tests à pratiquer :

- a) Epuration sanguine de la B S P
- b) L D H ou S G O T
- c) O C T sérique

B - ESSAIS PRATIQUES CHEZ LE RATIntoxication au tétrachlorure de carbone

a) Injection unique par voie sous cutanée de 1,2g/Kg de C Cl_4 à des rats fémmelles de 250 grammes environ.

Répartir en 3 lots :

1. lot témoin : 4
2. lot intoxiqué témoin : 10
3. lot traité intoxiqué : 10

Planification de l'essai

	24 h.	48 h.
Témoins	2	2
Intoxiqués	5	5
Traités	5	5

Tests à pratiquer :

- a) Epuration sanguine et élimination biliaire de la B S P (50 mg/Kg)
- b) Enzymes sériques (S G O T ou L D H)
- c) Lipides hépatiques

b) Par la technique décrite on peut procéder à une intoxication chronique par inhalation. Compte tenu des résultats obtenus nous pensons que l'inhalation répétée de tétrachlorure de carbone à la concentration de 0,3 - 0,5 ‰ (10-15 heures tous les deux jours) est susceptible de créer et d'entretenir une atteinte hépatique nette mais cependant réversible. La durée totale de l'essai sera de deux à quatre semaines et le nombre d'animaux ne sera pas inférieur à 20 unités par lot.

Peut-on encore, dans ces conditions parler d'une épreuve de triage ? L'ensemble de ces essais nécessite 800 souris et 50 rats et l'étude d'un seul produit chimique représente pour un personnel sinon spécialisé du moins averti au moins cinq cent heures de travail. (*) C'est la raison pour laquelle il n'existe pas encore, à notre connaissance, d'étude systématique sur cette catégorie de médicaments comme il en existe par exemple pour les anti-inflammatoires, les neuroleptiques, les hypotenseurs... En effet, pour la majorité des produits employés en thérapeutique, les tests de "screening" s'effectuent en général sur l'animal normal, mais dès que l'on s'intéresse à des substances concernant des maladies métaboliques de longue durée et encore mal définies comme l'athérome, le problème du triage prend une autre ampleur. C'est pourquoi nous pensons qu'avant d'entreprendre l'épreuve du "screening" selon le protocole proposé, il est indispensable plus encore que pour toute autre série pharmacologique, d'étudier la toxicité générale aiguë du produit et certaines de ses caractéristiques chimiques (synthèse, rendement, stabilité.)

(*) Le prix de revient d'une telle expérimentation qui est, selon nos estimations, de l'ordre de cinq mille francs peut faire reculer un chef d'entreprise.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié les conditions dans lesquelles il était possible de créer chez l'animal, plus particulièrement chez la souris et le rat, une hépatite toxique ou nutritionnelle.

Les critères biochimiques permettant d'objectiver une telle atteinte fonctionnelle ont été précisés et nous avons discuté leur signification. A la lumière de nos résultats nous avons cru pouvoir établir un protocole d'essai de triage des médicaments éventuellement doués d'une activité hépatoprotectrice. L'atteinte hépatique peut être créée en soumettant les animaux soit à un régime déséquilibré hypoprotéique-hyperlipidique, soit aux effets d'agents présentant une hépato-toxicité quasi élective, notamment l'éthionine, le tétrachlorure de carbone et la thioacétamide.

Les tests biochimiques qui nous paraissent les plus valables pour suivre l'évolution de la diathèse expérimentale sont les variations des taux de quelques enzymes sériques (la glutamique-oxalacétique transaminase, la lactico-déshydrogénase et l'ornithine-carbamyl transférase), les teneurs en lipides du tissu hépatique et les tests à la bromosulfoptaléine (épuration sanguine et élimination biliaire).

Malgré la complexité de tels essais il apparaît nécessaire de mettre en oeuvre tous les tests proposés dont l'ensemble seul constitue un triage valable dans ce domaine d'une série chimique nouvelle.

Le Président de la Thèse :
Professeur A. CIER

Vu et permis d'imprimer
Lyon, le 15 Mars 1965

Vu, le Doyen,
J.F. CIER

Le Recteur, Président du Conseil
de l'Université,
P. LOUIS

BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E *

1. ADAMS (H.R.), BUSCH (H.) - Effects of thioacetamid on incorporation of orotic acid 2-C⁻¹⁴ Into RNA fractions in liver.
CANCER RES. 1 53, 23, 576-82
2. AIYAR (A.S.), FATTERPAKER (M.) - Lipid metabolism in liver injury caused by CCl₄ in the rat - BIOCHEM. J. 1964, 90, 558-63
(CA 60 9739 c).
3. ALLEN (J.M.), - Multiple forme of LDH in tissues of the mouse - ANN. N.Y. ACAD. SCI. 1961, 94, 937
4. ALVIZOURI (M.) - Effect of DL ethionine on the pancreas and other organs - ARCH. PATH. 1954, 57, 130-7
5. ARNOLD K(H.), HARTMANN (F.) - The biochemistry of experimental cirrhosis of the liver ; the possibility of pharmacological influence.- DTSCH. ARCH. KLIN. MED. A1963, 209, 92-116.
6. ASADA (M.), GALAMBOS (J.T.) - Sorbitol deshydrogenase and hepatocellular injury : an experimental and clinical study. - GASTROENTEROLOGY, 1963/, 44, 5 8.
7. ASHWORTH (C.T.) - Production of fatty infiltration of the liver in rats by alcohol in spite of adequate diet - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1947, 66, 382-5.
8. ATERMAN (K.) - Toxic effect of CCl₄ on the liver cell - BRIT. J. PHARMACOL. 1962, 19, 219-25. (CA 57 17002 d).
9. AUZEPY (Ph.), BOIVIN (P.), FAUVERT (R.) - Le syndrome de cytolyse hépatique - REV. INT. HEPAT. 1961, 10, 483-580.
10. AUGARD (P.) - Influence de la vitamine B₁₂ et de la choline sur la stéatose diététique chez le rats- C.R. SOC. BIOL. 1957, 151, 251-3
11. AWAPARA (W.) - Distribution of transaminases in rat organes - J. BIOL. CHEM. 1952, 194, 497.

* Les références terminées par CA... ont été extraites des Chemical Abstracts auxquelles on pourra ainsi aisément se reporter.

12. BANI (A.) - Temps d'apparition de la BSP dans la bile - EPATOLOGIA 1962, 8, 154-5.
13. BANTING (F.G.), BEST (C.H.) - The effect of insulin on the percentage amount of fat and glycogen in the liver and other organs of diabetic animals - TRANS. ROY. SOC. CAN. 1922, 16, 39-42
14. BARTELS (H.) - Effect of ethionine on the metabolism of rat liver - BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 1963, 71, 214-16.
15. BARTOK (I.) - Histochemical studies of regenerating rat liver in experimental cirrhosis after partial hepatectomy - PATH. et MICROBIOL. 1962, 25, 209-20.
16. BARTOK (I.), HORVATH - Enzymatic histochemistry of normal and cirrhotic rat liver following partial hepatectomy - PATH. et MICROBIOL. 1963, 26, 415-26.
17. BEAUVALLET (M.) - Le foie gras par action sur l'état nutritionnel - ANN. NUTR. (PARIS) 1953, 1, 15-41.
18. BENGMARK (S.), OLSSON (R.) - GPT in rat liver after single injection of CCl_4 - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1962/ 109, 258.
19. BERNHARD (K.) - Les facteurs lipotropes - ANN. NUTR. (PARIS) 1953, 1, 253-67.
20. BEST (C.H.), HERSHEY (J.M.) - The control of the disposition of liver fat - AMER. J. PHYSIOL. 1932, 101, 7.
21. BEST (C.H.) - The effect of lecithine on fat deposition in the liver of the normal rat. - J. PHYSIOL. (LONDON) 1932, 75, 56-66.
22. BEST (C.H.), FERGUSON (G.C.), HERSHEY (J.M.) - Choline and liver fat in diabetic dogs - J. PHYSIOL. (LONDON) 1933, 79, 94-102.
23. BEST (C.H.), HUNTSMAN (M.E.) - Effect of choline on the liver fat of rats in various states of nutrition - J. PHYSIOL. (LONDON) 1935, 83, 255.
24. BEST (C.H.), CHANNON (H.J.) - The action of choline and other substances in the prevention and cure of fatty livers - BIOCHEM. J. 1935, 29, 2651-8.
25. BEST (C.H.), Mc LEAN (D.L.) - Choline and liver fat in Phosphorus poisoning. - J. PHYSIOL. (LONDON), 1935, 83, 275-84.
26. BEST (C.H.) - The lipotropic action of methionin - J. PHYSIOL. (LONDON) 1940, 97, 489.
27. BEST (C.H.), MAC LEAN (D.L.), RIDOUT (J.H.) - Choline and liver fat in phosphorus poisoning - J. PHYSIOL. (LONDON) 1944, 154, 9-19.
28. BLOCK (W.D.), CORNISH (H.H.) - Effect of CCl_4 inhalation on serum rat enzym - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1957, 97, 178-80.
29. BLUMBERG (H.), GRADY (H.C.) - The production of diffuse nodular cirrhosis of the liver in rats on high fat, low protein diets. J. BIOL. CHEM. 1941, 140, 15.
30. BLUMBERG (H.), GRADY (H.C.) - Production of cirrhosis of liver the liver in rats by feeding low protein high fat diets - ARCH. PATH. 1942, 34, 1035-41.
31. BLUME, BOERNING, FRUNDER (Hoppe-Seylers) Z. PHYSIOL. CHEM. 1962, 328, 145-63 (CA 57 12.825 h).

32. BOIVIN - Etude des transaminases dans les maladies du foie.-ANN. BIOL. CLIN. 1960, 18, 30-40.
33. BONOTTI (E.), STIRPE (F.) - Conditions affecting dietary liver necrosis and liver regeneration in rats.- J. NUTR. 1962, 11, 179-86.
34. BORNING, THIELMAN, RICHTER - Mitochondries et acides nucléiques du foie de souris intoxiquées au CCl_4 - (HOPPE-SEYLER), Z. PHYSIOL. CHEM. 1960, 322, 213-40 (CA 55 12612 i).
35. BOURDON (G.), FAUVERT (R.) - Etude expérimentale de l'épuration sanguine de la BSP par le foie chez le rat Wistar - REV. INT. HEPAT. 1958, 8, 473-524.
36. BRAUER (R.W.), PESSOTTI (R.L.) - The removal of BSP from blood plasma by the liver of rat - J. PHARMACOL. 1949, 97, 358-70.
37. BRAUER (R.W.), PESSOTTI (R.L.), PIZZOLATO (P.) - Isolated rat liver preparation - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1951, 78, 174-181.
38. BRAUER (R.W.), PESSOTTI (R.L.) - Hepatic uptake and biliary excretion of BSP in dog. - AMER. J. PHYSIOL. 1950, 162, 565-74.
39. BRAUER (R.W.), LEONG (G.F.), PESSOTTI (R.L.) - Vasomotor activity in the isolated perfused rat liver - AMER. J. PHYSIOL. 1953, 174, 304-312.
40. BRAUER (R.W.), PESSOTTI (R.G.), KREBS (J.S.) - The distribution and excretion of 355 labeled BSP administered to dogs by continuous injection. - J. CLIN. INVEST. 1955, 34, 35-43.
41. BRAUER (R.W.), KREBS (J.S.) - La conjugaison de la BSP - Etudes récentes sur la biochimie de ce phénomène et sur ses conséquences pour l'élimination de la BSP par le foie. - REV. INT. HEPAT. 1962, 12, 377-406.
42. BRAUN (P.), PAPP (M.), NEMETH (E.P.) - Serum leucine aminopeptidase activity : clinical and experimental study - GASTROENTEROLOGIA (Basel), 1961, 22, 57.
43. BRODEHL (J.) - Thioacetamid in der experimentellen Leberforschung - KLIN. WSEHR. 1961, 32, 956-62.
44. CABAUD (P.G.), WROBLEWSKI (F.) - Colorimetric measurement of LDH activity of body fluids - AMRR. J. CLIN. PATHOL. 1958, 30, 234.
45. CAIRELLA (M.) - Plasma and tissue enzymatic content in the experimental hepatopathy due to CCl_4 - EPATOLOGIA 1963, 5, 33-44.
46. CALDERA (C.M.), INFANTE (R.), SECHI - Ac nucléiques, bases puriques et pyrimidiques dans le foie de rats traités à l'éthionine - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1958, 34, 1927-9 (CA 55 12658 b).
47. CALDERA (C.M.), BUDINI (R.) - Effect of ethionine on the free nucleotide in rat liver - CANCER RES. 1962, 22, 1026-30.
48. CAMERON (G.R.), KARUNARATNE (W.E.) - CCl_4 cirrhosis in relation to liver regeneration.- J. PATH. BACT. 1936, 42, 1-21.
49. CAMERON (G.R.) - CCl_4 cirrhosis in relation to liver regeneration - J. PATH. BACT. 1936, 42, 1-21.
50. CANTAROW (A.), WIRTS (C.W.) - Studies on the biliary excretion of BSP - AMER. J. PHYSIOL. 1941, 133, 234.
51. CAROLI (J.), ALLIOT (G.), RICHARD - Epreuve de la BDP - SEM. HOP. PARIS 1950, 1110-21.

52. CAVAZZUTI (F.), ALBERTINI (B.), LASAGNA (G.C.) - Alterazioni del tromboelastogramma dopo trattamento con etionina - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1959, 35, 1402-5.
53. CAVAZZUTI (F.), LASAGNA (G.C.), ALBERINI (B.) - Il test all durezza nello studio del danno emocoagulativo indotto dall'etionina - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1959, 35, 1405-8.
54. CAVAZZUTI (F.), LASAGNA (G.C.), ALBERINI (B.) - Etionina e coagulabilità ematica : valutazione con il test di tolleranza eparinica in vitro - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1959, 35, 1408-11.
55. CELANDER, GEORGE (M.J.) - Dietary interrelations of ethionine and methionine in the weanling rat - BIOCHEM. J. 1963, 87, 143-6 (CA 60 914 a).
56. CHABROL (E.), CHARONNAT (R.) - Une nouvelle réaction pour l'étude des lipides. L'oleidemie - PRESSE MED. 1937, 45, 1713-4.
57. CHAIKOFF (I.L.), EICHORN (K.B.), CONNOR (C.L.) - The production of cirrhosis in the livers of the normal dog by prolonged feeding of a high fat diet - AMER. J. PATHOL. 1938, 38, 969.
58. CHANY (E.) - Steatose hépatique ou nutritionnelle ou par agression en fonction de la souche et du sexe des rats. - ARCH. SCI. PHYSIOL. 1962, 16, 255-72.
59. CHANNON (H.J.), MANIFOLD (M.C.) - The action of cystine and methionine on liver fat deposition - BIOCHEM. J. 1938, 32, 969.
60. CHARBONNIER (A.), BRISBOIS (P.) - Etude chromatographique de la BSP au cours de l'épreuve clinique d'épuration plasmatique de ce colorant - REV. INT. HEPAT. 1960, 10, 1163-1213.
61. CHATAGNER (F.), TRAUTMANN (O.) - Effect of DL ethionine on the level of cystathionase in rat liver - NATURE (LONDON) 1963, 200, 75.
62. CHERNICK (S.S.), SCHWARTZ (K.) - Dietary necrotic liver degeneration and CoA - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1955, 89, 520-3.
63. CHRISTIE (G.S.), JUDAH (J.D.) - Activity mechanism of CCl_4 on liver cell - PROC. ROY. SOC. B. 1954, 142, 241-57.
64. CIER (A.), COQUET (B.) - Les hépatites expérimentales - BULL. SOC. PHARM. LYON, Juin 1964.
65. COHEN - Amino-acids mixture in treatment of experimental dietary cirrhosis in rat - ARCH. INT. MED. 1958, 101, 291.
66. COLALONGO (G.), INESI (G.) - Gli aminoacidi nella terapia dell'intossicazione epatica sperimentale da CCl_4 - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1957, 33, 322-26.
67. COQUET (B.), CIER (A.), FRANDON (A.) - L'épuration sanguine de la bromosulfophtaléine chez la souris dans les hépatites aiguës expérimentales - C.R. SOC. BIOL. Séance du 16 Nov. 1964.
68. CORNATZER (W.E.), DUANE - Analyses of cellular fractions in liver necrosis - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1956, 287-90.
69. CUTLER (J.T.) - The accumulation of guanidine in the blood following acute liver injury by CCl_4 , CHCl_3 , arsenic or phosphorus - J. PHARMACOL. EXP. THER. 1931, 41, 345-77.
70. DAVIS (M.L.), COSGRAVE (G.E.) - Liver damage in mice treated with a radiomimetic agent - LAB. INVRST. 1963, 12, 991-6.

71. DEBRAY (Ch.), BESANCON (F.) - L'élimination biliaire de la BSP et de la bilirubine au cours de l'obstruction biliaire partielle expérimentale - REV. INT. HEPAT. 1961, 11, 70-89.
72. DEBRAY (Ch.), HARDOUIN - Test à la BSP pour les substances hépatotoxiques chez l'homme - THERAPIE, 1963, 3, 684.
73. DELSAL (J.L.) - Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal - BULL. SOC. CHIM. BIOL. 1944, 26, 99.
- 73 bis. DEMANGE (G.), BALLAN (P.) - Dosage de l'ornithine carbamyltransférase dans le sérum - PRESSE MED. 1962, 70, 1032-4.
74. DINMAN (B.D.), FOX (C.F.) - Serum enzyme and B_{12} changes in CCl_4 hepatotoxicity - ARCH. ENVIRONM. HLTH. 1962, 4, 168.
75. DINMAN (B.D.) - CCl_4 toxicity, hepatostructural and enzymatic change - ARCH. ENVIRONM. HLTH. 1963, 7, 630-46.
76. DREVON (B.), SCHMIT (J.M.) - La réaction sulfo-phosphovanillique dans l'étude des lipides sériques - BULL. SOC. PHARM. LYON, Réunion du 17 avril 1964.
77. DRILL (V.A.) - Hepatotoxic agents : mechanisms of action and dietary interrelationship - PHARMACOL. REV. 1952, 4, 1-42.
78. DU VIGNEAUD (V.), CHANDLER (J.P.) - The effect of choline on the ability of homocystine to replace methionine in the diet - J.BIOL. CHEM. 1939, 131, 50.
79. DU VIGNEAUD (V.), CHANDLER (J.P.), COHN (M.) - The transfert of the methyl group from methionine to choline and creatine - J.BIOL. CHEM. 1940, 144, 787.
80. EGER (W.) - Substances protégeant le foie d'agents nécrosants (alcool allylique) - MED. WELT. (BERL.) 1960, 2249-55 (CA 55 2887 e).
81. EGER (W.) - Influence des acides gras sur la résistance non spécifique de l'organisme - MED. EXP. 1961, 4, 251-6 (CA 56 4046 c).
82. FARBER (E.), SIMPSON - Studies on ethionine : the interference with lipid metabolism, - J. BIOL. CHEM. 1950, 182, 91-99.
83. FARBER (E.), POPPER - Acute pancreatitis with Ethionine and its prevention by Methionine - PROC. SOC. EXPT. BIOL. 1950, 74, 838-40.
84. FARBER (E.), POPPER, KOCH, WESER - The influence of sex and of testosterone upon fatty liver due to Ethionine - ENDOCRINOLOGY 1951, 48, 205-12.
85. FARBER (E.), CORBAN - Sex difference in ethionine inhibition of hepatic protein synthesis - J. BIOL. CHEM. 1958, 233, 625-30.
86. FAUVERT, BENHAMOU - Comparaison des clearances hépatiques de l' AU^{198} et de la BSP - REV. FRANC. ETUD. CLIN. BIOL. 1958, 3, 868-74.
87. FAUVERT (R.), BENHAMOU (J.P.), NICOLLO (S.), LOVERDO (A.) - Etudes cliniques sur les clearances hépatiques - REV. INT. HEPAT. 1958, 8, 525-547.
88. FAUVERT (R.) - Exploration fonctionnelle du foie. ANN. BIOL. CLIN. 1961, 19, 771-775.
89. FAUVERT (R.), BOIVIN (P.) - Les enzymes sériques dans les maladies du foie - ANN. BIOL. CLIN. 1964, 5-6, 675-704.

90. FEINBERG - Reduction of serum lipides and lipoproteins by ethionine feeding in the dog - SCIENCE 1954, 120, 317.
91. FEIGENBAUM (A.S.), FISCHER - Changes in fatty acid composition in nutritional fatty degeneration of the liver - BRIT. J. NUTR. 1963, 17, 31-7, 39-59. (CA 59 10533 g).
92. FIESSINGER (N.) - Nouveaux procédés d'exploration fonctionnelle du foie - MASSON et Cie, Paris 1934.
93. FIGUEROA, KLOTZ - Alterations of alcohol dehydrogenase and other hepatic enzymes following oral alcohol intoxication - AM. J. CLIN. NUTR. 1962, 11, 235-9. (CA 57 15447 h).
94. FITZHUGH (O.G.), NELSON - Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide - SCIENCE 1948, 108, 626-8.
95. FITZGERALD (P.J.), ALVIZOURI (M.) - Rapid restitution of the rat pancreas following acinar cells necrosis subsequent to ethionine - NATURE 1952, 170, 929-30.
96. FIUME (L.) - Inhibition by aminoacetonitrile of early lesions induced in the liver of rats by CCl_4 - J. PATH. BACT. 1962, 83, 291-3.
97. FIUME - Inhibition by aminoacetonitrile of allylamine induced lesions in the rat's liver - J. PATH. BACT. 1962, 84, 256-8. (CA 57 14392 c).
98. FIUME (L.) - Topographic distribution of hepatic necrosis in bromobenzene, thioacetamide, and tannic acid poisoning and inhibition by aminoacetonitrile of necrosis induced by bromobenzene - NATURE 1963, 197, 394-5.
- 98 bis. FRANDON (A.), CIER (A.), COQUET (B.) - Test à la bromosulfo-phthaléine et intoxication au tetrachlorure de carbone chez le rat - Etude des divers paramètres - (à paraître).
99. FRIEND (C.), XROBLEWSKI (F.), LA DUE (J.S.) - SGOT activity in mice with viral hepatitis - J. EXP. MED. 1955, 102, 699.
100. FRUNDER, BLUME, THIELMAN - Distribution de l'ATP intracellulaire dans le foie de souris normales et intoxiquées - Z. PHYSIOL. CHEM. 1961, 325, 146-63. (CA 56 7842 c).
101. GALLAGHER (C.H.) - Biochemical changes in liver acute thioacetamide intoxications - J. PATH. BACT. 1956, 72, 193-201.
102. GALLAGHER, REES - Levels of pyridine nucleotides in liver poisoning - NATURE 1960, 187, 148-9.
103. GALLI (A.), JEANMAIRE (J.), CHOISY (H.) - Test de la BSP en analyse continue - ANN. BIOL. CLIN. 1961, 12, 759-67.
104. GLYNN, HIMSWORTH (H.P.), NENBERGER (A.) - Pathological states due to deficiency of the sulphur containing amino-acids - BRIT. J. EXP. PATH. 1945, 26.
105. GOLDSCHMIDT (S.), VARS (H.M.) - The influence of foodstuffs upon the susceptibility of the liver to injury by $CHCl_3$ and probable mechanism of this action - J. CLIN. INVEST. 1939, 18, 277-89.
106. GUPTA (D.N.) - Acute changes in the liver after administration of thioacetamide - J. PATH. BACT. 1956, 72, 183-92.
107. GYORGY (P.), GOLDBLATT (H.) - Hepatic injury on a nutritional basis in rats - H. EXP. MED. 1939, 70, 185-92.

108. HALL - The use of CCl_4 for the removal of hook worms - J. AMER. MED. ASS. 1921, 71, 1641-43.
109. HALLEDY (H.), BENITZ - BSP retention and morphological damage in dogs - TOXICOL. APPL. PHARMACOL. 1963, 5, 650-60.
110. HALPERN (B.N.) - FAUVERT - Cinétique de l'épuration sanguine des suspensions colloïdales comme mesure de la circulation hépatique - REV. FRANC. ETUD. CLIN. BIOL. 1958, 3, 549-57.
111. HARTMANN (F.) - Biochemical and electron microscopic investigations of fibrosis and cirrhosis of the liver - SYMP. INTERN. ASSOC. STUDY LIVER Munich 1962, 32-7.
112. HASHIMOTO, TSUNINARI - Effects of pyridine nucleosides upon liver damage - BITAMIN. 1963, 28, 275-85 (CA 60 8521 g).
113. HAUSS (W.H.), LEPPELMAN (H.J.) - Reactive changes of enzyme activities in serum and liver as symptom of acute syndrom - ANN. N.Y. ACAD. SCI. 1958, 75, 250-9.
114. HEIMBERG, WEINSTEIN - The action of CCl_4 on the transport and metabolism of triglycerids and fatty acids by the isolated perfused rat liver and its relation to the etiology of fatty liver. - H. J. BIOL. CHEM. 1962, 237, 3623-27.
115. HEPPEL (L.A.), PORTERFIELD (V.T.) - Toxicology of 1-2 dichloroethane. Its detoxification by cysteine DL methionine and certain other sulfur containing compounds - J. PHARMACOL. EXP. THER. 1947, 91, 385-93.
116. HERSHEY (J.M.) - Substitution of lecithin raw pancreas in the diet of the depancreatized dog - AMER. J. PHYSIOL. 1930, 91, 657-8.
117. HORN (H.D.), AMELUNG (D.) - Die bedeutung von transaminase und Milchsäuredehydrogenase Bestimmungen im Serum bei Leberkrankungen - DTSCH. MED. WSCHR. 1957, 82, 619.
118. HORNING - Changes in fatty acid composition of liver lipids induced by CCl_4 and ethionine - BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 1962, 56, 175-7.
119. HORVATH, SOLYON, KORPASSY - Histochemical and biochemical studies in acute poisoning with tannic acid - BRIT. J. EXP. PATH. 1960, 41, 298-304.
120. HUTTERER, FITSCHEN - Mitochondrial damage and hepatic steatosis in ethionine intoxication - BRIT. J. EXP. PATH. 1961, 42, 187-194.
121. INFANTE (R.), CALDERA (C.M.) - Effetti della somministrazione dietetica di DL ethionina sul glicogeno, lipidi totali e fosfolipidi epatici del ratto - BOLL. SOC. ITAL. BIOL. SPER. 1959, 35, 792-93.
122. JENSEN (D.), CHAIKOFF (I.L.) - The ethionine induce fatty liver Dosage prevention and structural specificity - J. BIOCHEM. 1951, 122, 395-403.
123. JESEQUEL (A.M.) - N les effets de l'intoxication aiguë au phosphore sur le foie de rat. Etude au microscope électronique - ANN. ANAT. PATH. 1958, 3, 512.
124. JEUNET (F.), QUITT (J.) - Perfusion du foie isolé, techniques et applications - J. PHYSIOL. (PARIS) 1962, 54, 625-636.
125. JOGLEKAR (G.V.) - Protection by indigenous drugs against hepatotoxic effects of CCl_4 in mice - ACTA PHARMACOL. (Kobenhavn) 1963, 20, 73-9.

126. JUSTIN-BESANCON (L.), LAMOTTE (M.), LAMOTTE BARILLON (S.) -et DEBAY (A.) - Stéatoses hépatiques expérimentales par déséquilibre diététique - PATH. et BIOL. 1959, 1, 1719-36.
127. KERBEL (N.C.) - Malothane hepatotoxicity - CANADA MED. ASS. J. 1963, 82, 944-6.
128. KLEIN - Electrophoresis in starch gel of soluble liver proteins after experimental parenchyma injury by CCl_4 and thiocedamide - NATURWISSENSCHAFTEN 1963, 50, 670. (CA 60 ³411 bt).
129. KLEIN (R.J.), LEVINSON (S.A.) - Removal of BSP from the blood stream by the reticulo endothelial system. - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1933, 31, 179-81.
130. KLIEVE, GILLISSEN - Etudes comparatives sur les effets biologiques de vins hybrides - MED. EXPTL. 1961, 4, 227-33.
131. KNAUFF, GEORGII, MATZEN - The influence of choline phospholipids on spectrum of plasma free aminoacids in toxic liver injuries - KLIN. WOCHSCHR. 1963, 41, 915-19. (CA 60 2238 g).
132. KOBAYASHI - Effects of aminoacids on experimental liver damage 1) effect of methionine - 2) effect of glutamic acid ad cystine - MED. J. SHINDHU. UNIV. 1959, 4, 163-72 (CA 56 2864 b).
133. KOCK-WESER (D.), FARBER - Fatty liver and without necrosis histological and biochemical investigations - ARCH. PATH. 1951, 51, 498-509.
134. KREBS (J.), BRAUER (R.W.) - Uptake of BSP by the liver of rat studies with radioactive BSP - FED. PROC. 1949, 8, 319.
135. KREBS (J.S.) - Relation of the metabolism of BSP to its blood clearance in the rat - AMER. J. PHYSIOL. 1959, 197, 292.
136. KREBS (J.S.), BRAUER (R.W.) - Modification of BSP metabolism by bile stasis and liver injury - AMER. J. PHYSIOL. 1960, 198, 774-8.
137. KUTOB (S.D.), PLAA (G.L.) - Assessment of liver function in mice with BSP - J. APPL. PHYSIOL. 1962, 17, 123-125.
138. KUTOB (S.D.), PLAA (G.L.) - The effect of acute ethanol intoxication chloroform induced liver damage - J. OF PHARMACOL. AND EXP. THRR. 1962, 135, 245-251.
139. KYLIN (B.), REICHARD (H.) - Hepatotoxic effect of trichlorethylene and tetrachlorethylene on mice - NATURE 1962, 193, 395.
140. KYLIN (B.) - Hepatotoxicity of inhaled trichlorethylene tetrachlorethylene and chloroform; single exposure - ACTA PHARMACOL. (Kobenhavn), 1963, 20, 16-26.
141. LAMSON (O.E.), GARDNER (G.H.) - The pharmacology and toxicology of CCl_4 - J. PHARMACOL. EXP. THER. 1923, 22, 215-88.
142. LEDUC - Injury to liver cells in CCl_4 poisoning - ARCH. PATH. 1958, 65, 147.
143. LELUAN (G.) - Mise au point d'une technique simple de détermination de l'activité de l'OCT sérique - ANN. BIOL. CLIN. 1964, 22, 343-7.
144. LEVY (M.) - Les stéatoses, leur étiologie, les troubles métaboliques qui les accompagnent; action des facteurs lipotropes - PRESSES UNIVERSITAIRES DE FRANCE 1956.
145. LEVY (M.) - La choline, facteur lipidique - ANN. NUT. ALIM. 1948, 2, 179.

146. LEVY (M.) - Action de la choline et de l'inositol sur les troubles observés chez les animaux présentant divers types de stéatose - ARCH. SCI. PHYSIOL. 1958, 11, 157.
147. LOWRY (J.V.), ASHBURN (L.) - Effect of alcohol in experimental liver cirrhosis - QUART. J. STUD. ALCOHOL 1942, 3, 168-75.
148. LUNZENAUER (K.) - Inclusions intracytoplasmiques dans les hépatocytes de rat pendant une intoxication chronique à l'alcool allylique - Z. GES. INN. MED. Ihre Grenzgebiete 1962, 17, 525-30. (CA 58 807 g).
149. MC HENRY - Vitamine B₁ and fatty livers - J. PHYSIOL. 1937, 82, 287.
150. MARKEES (S.) - Influence of experimental liver damage on total lipids and on insaturated fatty acids in serum and liver - EXPERIENTIA 1964, 20, 50-4.
151. MAZZANTI - Action biologique de la DL ethionine sur des rats soumis à un régime lipogène - ARCH. ITAL. SCI. FARMACOL. 10, 257-83. (CA 56 755 c).
152. MELOIRE, TURNER - Incorporation of ethionine in the proteins of rat - J. BIOL. CHEM. 1951, 192, 835-50
153. MEYER (J.R.), PESSOA (S.B.) - A study on the toxicity of CCl₄ - AMER. J. TROP. MED. HYG. 1923, 3, 177-96.
154. MILCOU (S.M.), VAISLER (L.), BIENER (J.) - Nouvelles recherches sur l'action hépatoprotectrice du méthylthiouracile - THERAPIE 1960, 7, 1312-17.
155. MOLANDER (D.W.), WROBLEWSKI (F.), LA DUE (J.S.) - SGOT as an index of hepatocellular integrity - J. LAB. CLIN. MED. 1955, 46, 831.
156. MORETTI (G.F.), STAEFFEN (J.) - Une expression spécifique de la cytolysé hépatique : l'activité O.C.T. du sérum - REV. INT. HEPAT. 1961, 11, 545.
157. MOXON (A.L.), RHIAN (M.) - PHYSIOL. REV. 1943, 23, 305
158. MULFORD (D.J.), GRIFFITHS (W.H.) - Choline metabolism. The relation of cystine and of methionine to the requirement of choline in young rats - J. NUTR. 1942, 23, 91.
159. MURARI (G.) - Action d'eau minérale contenant des sulfates du bicarbonate et du calcium sur la clearance hépatique du rat. - ANN. MED. (Milan) 1962, 6, 233-7 (C.A. 59 444 a).
160. NAKAMURAT (T. et S.), KAWAMURA (E.) - Studies on influence of proteine on the liver injury due to chloroform and carbon tetrachlorid - TOKOHU J. EXP. MED. 1958, 61, 373-80.
161. NATORI (Y.) - Differences due to sex in incorporation of ethionine in vivo in proteins of rat - J. BIOL. CHEM. 1961, 236, 2821-23.
162. NATORI (Y.) - Studies on ethionine : sex dependant behavior of methionine and ethionine in rats - J. BIOL. CHEM. 1963, 238, 2075-80.
20
163. NIVOLA (P.), PETRONIO (L.) - Il quadro enzimatico nel siero e negli organi in corso di intossicazione con CCl₄ - FEGATO, 1958, 4, 280-93.

164. NOBUYUKI (I.) - Relation between the functional activity of reticuloendothelial system and quantitative histologie in the liver of rats ingesting D-L Ethionine, thioacetamide or naphthyl isothiocyanate - GANN. 1962, 52, 235-45.
165. NORRIS (F.H.) - Lack of necrosis in dog liver after anesthesia with Halothane - ARCH. INT. PHARMACODYN. 1963, 145, 405-12.
166. NYS (A.), ALLIOT (G.) - Etude critique du test de la BSP - PATH. ET BIOL. 1956, 1001.
167. OBERLING (Ch.) - Effets de l'intoxication aiguë au CCl_4 sur le foie de rat. Etude au microscope électronique. ANN. PATH. 1956, 1, 401-22.
168. OLIVECRONA - Metabolism of palmitic (C 14) acid in rats with ethionine induced fatty livers - ACTA PHYSIOL. SCAND. 1962, 54, 287-94.
169. OLIVECRONA - Plasma and liver lipids of ethionine treated rats. Fatty acids composition of plasma and tissue lipids of normal and ethionine treated rats - ACTA PHYSIOL. SCAND. 1962, 55, 291-302 et 303-12.
170. PAINTER (E.P.), FRANK (K.W.) - On the relation of selenium to sulfur and nitrogen deposition in cereals - AMER. J. BOTANY, 1940, 27, 336-8.
171. PETZOLD (H.), POHL (E.) - Influence de la vitamine A sur la cirrhose hépatique produite chez le rat par la thioacétamide - ACTA HEPATO-SPLENOL 1964, 11, 94-102 (CA 61 8782 h).
172. PETZOLD (H.), ROSAM - Effet de différents phospholipides essentiels sur l'atteinte hépatique chez le rat intoxiqué à l'éthionine - DEUT. Z. VERDAU. STOFFWECHSELKR. 1963, 23, 145-61. (CA 60 8523 a).
173. PLAA (G.L.), HINE (C.H.) - The effect of carbon CCl_4 on isolated perfused rat liver function - ARCH. OF. IND. HEALTH 1960, 21, 114-123.
174. PLOTTNER (K.), KUHN H.A. - Die quantitative Bestimmung der renalen Bromsulphaleinausscheidung als Leberfunktionsprobe - DEUTSCH. MED. WOCHECHR. 1958, 83, 2051-5.
175. POJER (J.), JEZEK P., NINGER (E.) - Sorbit deshydrogenase bei Leberkrankungen - GASTROENTEROLOGIA 1961, 96, 26.
176. POPPER (H.) - Transformation de l'hépatite en cirrhose - REV. INT. HEPAT. 1958, 8, 182-91.
177. POST, KLEIN, HOFFMAN - Responses of the liver to injury. Effects of age on the healing pattern after acute CCl_4 poisoning - AMA. ARCH. PATH. 1960, 70, 314-21.
178. RABBI, CASTELLI - Effets Initiaux de l'administration en régime d'éthionine chez le rat - BOLL. SOC. ITAL. BIOL. SPER. 1958, 34, 1921-37 (CA 55 12657 h).
179. RABBI, CALDERA - Effets de l'administration de composés cancérogènes sur les nucléotides libres du foie. BOLL. SOC. ITAL. BIOL. SPER. 1962, 38, 1909-12 (CA 60 4591 b).
180. RECHNAGEL - Biochemical changes in fatty liver induced by CCl_4 . J. BIOL. CHEM. 1959, 234, 1052-59.
181. REES (K.R.) - Fat accumulation in acute liver injury - PROC. ROY. SOC. (LONDON) 1963, 157, 517-35.

182. REES (K.R.), SINNA (K.P.) - Pathogenesis of liver injury in CCl_4 and thioacetamid poisoning - J. PATH. BACT. 1961, 81, 107-18.
183. REICHARD (H.), REICHARD (P.) - Determination of ornithine carbamyl transferase in serum - J. LAB. CLIN. MED. 1958, 52, 709-17.
184. REICHARD (H.) - O.C.T. in dog serum on intravenous injection of enzyme choledochus ligation and CCl_4 poisoning - J. LAB. CLIN. MED. 1961, 57, 78.
185. REITMAN (S.), FRANKEL (S.) - A colorimetric method for the determination of SGOT and SGPT - J. CLIN. PATH. 1957, 28, 56.
186. REYNOLDS (E.S.) - Liver parenchymal cell injury. Initial alterations of the cell following poisoning with CCl_4 . - J. CELL. BIOL. 1963, 19, 139-57.
187. RIBEIRO - Serum lipoprotein levels in rat with liver damage induced by CCl_4 - CLIN. CHIM. ACTA, 1963, 8, 727-30.
188. RICH (A.R.), HAMILTON (J.H.) - The experimental production of cirrhosis of the liver by means of a deficient diet - BULL. JOHNS HOPKINS HOSP. 1940, 66, 185-98.
189. RICHTERICH (R.) - Dysfonctions enzymatiques du foie - MED. et HYG. (GENEVE) 1961, XXIX (516), 677-80.
190. RITIS (de) (F.), COLTORTI (M.), GIUSTI - Serum and liver transaminase activities in experimental virus hepatitis in mice - SCIENCE 1956, 124, 32.
191. ROSENTHAL (S.M.), WHITE (E.C.) - Clinical application of the BSP test for hepatic function - J. AMER. MED. ASS. 1925, 84, 1112-4.
192. ROSENTHAL (S.M.) - Some effects of alcohol upon the normal and damaged liver - J. PHARMACOL. EXP. THER. 1930, 38, 291-301.
193. ROSIN (A.), DOLJANSKI (L.) - Studies on the early changes in the liver of rats treated with various toxic agents. The histology of rat's liver with allyl formate poisoning - AMER. J. PATHOL. 1946, 22, 317.
194. ROUX (J.) - Contribution à l'étude des foies gras obtenus par intoxication - BIOL. MED. 1960, 49, 502-68.
195. RUMLER - Influence of small selenite upon toxic fatty degeneration of liver - ACTA BIOL. MED. GERM. 1963, 11, 200-2. (CA 60 8522 h).
196. ROTTNER (J.R.), RONDEZ (R.) - Histochimie du foie intoxiqué - SCHWEIZ. Z. ALLG. PATH. U. BACTERIOLOG. 1959, 22, 294-300.
197. SALOMON (H.) - Changes in the liver parenchymal cells of the rat induced by thioacetamide; electron microscopic of the lesions observed in the late phase of chronic poisoning - J. ULTRA-STRUCT. RES. 1962, 1, 293-307.
198. SAVEL (M.J.) - Essai pharmacodynamique et standardisation du pouvoir antitoxique des extraits hépatiques - ANN. PHARM. FRANÇ. 1960, XVIII, 329-36.
199. SAVEL (J.), LEROI (E.) - Etude expérimentale comparée du pouvoir hépatoprotecteur de certains dérivés de la betaïne, de la choline et de la méthionine - PATH. et BIOL. 1964, 12, 718-22.
200. SAVEL (J.), LEROI (E.) - Action du citrate de Betaïne sur la stéatose hépatique d'origine alimentaire chez le rat - PATH. et BIOL. 1964, 12, 837-41.

201. SCHAPIRA (F.) - L'aldolase sérique - 1959 Lanord ed. PARIS.
202. SCHATZKI (P.F.) - Rat liver adenosine -Triphosphatase changes following experimental CCl_4 administration - ARCH. PATH. 1963, 15, 85-90.
203. SCHMIT (J.M.) - Contribution à l'étude analytique des lipides par la réaction sulfo-phospho-vanillique - Thèse Doct. Phie. LYON 1964.
204. SCHWARZMANN (V.) - Les hépatites toxiques expérimentales - REV. INT. HEPAT. 1957, 1, 387-429.
205. SCHWIETZER (C.H.) - FREIBURGER SYMPOSIUM MED. UNIV. KLINIK 1957, 4, 163-7.
206. SCHWARZ (K.) - Liver necrosis versus fatty liver and cirrhosis - ANN. N.Y. ACAD. SCI. 1954, 51, 617.
207. SEIDEL (J.C.) - Effects of ethionine and methionine on serum lipids and lipoproteins - PROC. SOC. EXPTL. BIOL. MRD. 1962, 111, 579-82.
208. SHULL (H.) - Hepatic phosphor ylase and ATP levels in ethionine treated rats - J. BIOL. CHEM. 1962, 237, 1734-5.
209. SIDRANSKY (H.), FARBER (E.) - Chemical pathology of acute amino acids deficiencies ; Morphologic and biochem. ; changes in rats fed threonine or methionine devoid diets - ARCH. PATH. 1958, 66, 119-34, 135-49.
210. SIMMONDS (S.), KELLER (E.B.), CHANDLER, DU VIGNEAUD - The effect of ethionine on transmethylation from methionine to choline and creatinine in vivo - J. BIOL. CHEM. 1950, 183, 191-5.
211. SIMPSON (M.), FARBER (E.) - Studies on ethionine ? Inhibition of protein synthesis in intact animals - J. BIOL. CHEM. 1950, 182, 81-9.
212. SPELLBERG (M.A.) - Diseases of the liver - 1954, GRUNE and STRATTON ed. New-York.
213. STEIN (R.J.), KENT (G.), BARKA, POPPER (H.) - Effect of methionine upon ethionine intoxication of the rat - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1960, 210-3.
214. STEKOL J.A., BEDRAK (E.) - Inhibition of the synthesis of phosphopyridine nucleotide by ethionine administration - J. BIOL. CHEM. 1963, 238, 469-73.
215. STENGER (R.G.) - Hepatic parenchymal cell alterations after long term CCl_4 administration. A light and electron microscopy study - AMER. J. PATHOL. 1963, 43, 867-95.
216. STOWELL (R.E.), LEE (C.S.) - Histochemical and micro chemical changes in experimental cirrhosis and hepatome formation in mice by CCl_4 - CANCER RES. 1951, 11, 345.
217. SUVA, MATEJKA, KRISKA - Effet de l'acide ascorbique sur les lésions hépatiques expérimentales. Transaminases sériques dans les lésions au CCl_4 - CESKOSLOV. GASTROENTEROL. VYZIVA 1963, 17, 337-42. (CA 60 8499 g).
218. TAI HA WOO - Renal and hepatic excretions of phenol red and BSP in dog - AMER. J. PHYSIOL. 1963, 204, 776-80

219. THERET (C.) - Les cancers hépatiques expérimentaux - REV. INT. HEPAT. 1961, 11, 1-47, 641-719 - 1962, 12, 1-82.
220. THOENES (W.), BANNASCH - Electron and light microscopic studies of the cytoplasm of liver cells after acute and chronic thioacetamide intoxication - ARCH. PATH. ANAT. PHYSIOL. 1962, 335, 556-83.
221. THOMSON (R.A.), MAC KAIG - BSP dye retention test intoxicological investigations - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1957, 95, 243.
222. TRADWELL (C.R.), GROOTHINS (M.) - The influence of suppletary casein cystin and methionine on liver lipid - J. BIOL. CHEM. 1942, 142, 653.
223. TREMOLIERES (J.), LOWY (R.) - Résultats de recherches récentes sur les mécanismes biochimiques de la toxicité de l'alcool éthylique - ANN. BIOL. CLIN. 1964, 22, 1023-33.
224. TROPEANO L. - BELFIORE F. - Attivata arginasi nel siero di cavia intossicate con CCl_4 - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1959, 35, 1081-4.
225. TROPEANO (L.), NIMNARI (A.) - GOT et GPT dans les divers organes du cobaye - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1958, 34, 1138-41.
226. TROPEANO (L.), BELFIORE (F.) - Attivata arginasi nel siero di cavia intossicate con CCl_4 . E trattate con complesso vitaminico epatoprotettore - BOLL. SOC. ITAL. BIO. SPER. 1959, 35, 1084-6.
227. TRUHAUT (R.), AMAR (A.) - Recherche d'une activité monoamine oxydase et catechol-o-methyl transferase dans le plasma des rats intoxiqués par le CCl_4 - ANN. BIOL. CLIN. 1964, 22, 1055-65.
228. VAISNER, COSTINER - Action protectrice de la vitamine B_{12} contre la cirrhose expérimentale du foie chez le rat blanc - ACAD. REP. POPUL. ROMINE 1960, 11, 769-71 (CA 55 11647 a).
229. VERNE (J.), CECCALDI, HEBERT, ROUX - Etude biochimique et histochimique des foies gras obtenus par le trichloréthylène - PATH. et BIOL. 1959, 1, 2311-6.
230. VERNE (J.), CECCALDI, HEBERT, ROUX - Recherches sur la steatose hépatique au cours des intoxications par composés organiques volatils - Etude nistochimique et biochimique des foies gras obtenus par CCl_4 - PATH. et BIOL. 1958, 6, 9-13.
231. VILLA (L.) - La régulation enzymatique du foie - REV. INT. HEPAT. 1961, 11, 483-91.
232. VILLA, TREVINO - The role of ATP deficiency in ethionine induced inhibition of protein synthesis. - J. BIOL. CHEM. 1963, 238, 1757-63.
233. VILLA, TREVINO, FARBER (E.) - Reversal by ATP of ethionine induced inhibition of protein synthesis - BIOCH. BIOPH. ACTA 1962, 61, 649-51.
234. WACHSTEIN (M.), MEISEL (E.) - Enzymic histochemistry in the experimentally damaged liver - AMER. J. PATHOL. 1962, 40, 219-41.
235. WACHSTEIN (M.), MEISEL (E.) - Enzymatic histochemistry of ethionine induced liver cirrhosis and hepatoma - J. HISTOCHEM. CYTOCHEM. 1959, 1, 189.
236. WACHSTEIN (M.), MEISEL (E.) - Nephrotoxic action of DL ethionine - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1951, 71, 648-51.

237. WAHL (P.N.) - Diet and cirrhosis of the liver - ARCH. PATH. 1949, 47, 119.
 238. WAKIM (K.G.), MANN (F.C.) - Effect of experimental cirrhosis on the intrahepatic circulation of blood in the intact animal - ARCH. PATH. 1942, 33, 198-203.
 239. WEST (M.), ZIMMERMAN (H.J.) - LDH and SGOT in carcinoma - ARCH. INT. MED. 1958, 102, 103.
 240. WHELAN (F.J.), PLAA (G.L.) - The application of thin layer chromatography to BSP metabolism in studies - TOXICOL. APPL. PHARMACOL. 1963, 5, 457-63.
 241. WHIPPLE (G.H.), SPERRY (J.A.) - Chloroform poisoning liver necrosis and repair - BULL. JOHNS HOPKINS HOSP. 1909, 20, 278-89.
 242. WHITE (J.), JACKSONS (R.W.) - The effect of Bromobenzene on the utilisation of cystine and methionine by the growing rat - J. BIOL. CHEM. 1935, 111, 507-13.
 243. WROBLEWSKI (F.), LA DUE (J.S.) - SGT activity as an index of liver cell injury - ANN. INT. MED. 1955, 43, 345.
 244. WROBLEWSKI (F.), LA DUE (J.S.) - LDH activity in blood - PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 1955, 90, 210.
 245. WROBLEWSKI (F.) - The clinical significance of transaminases activities of serum - AMER. J. MED. 1959, 27, 911.
 246. WROBLEWSKI (F.), GREGORY (K.F.) - LDH isoenzymes and their distribution in normal tissue and plasma in disease states - ANN. N.Y. ACAD. SCI. 1961, 94, 912.
 247. ZAKI (F.G.), BANDT (C.) - Fatty cirrhosis in the rat liver lipids and collagen content in various stages. The influence of different levels of dietary fat - ARCH. PATH. 1963, 75, 648-53.
 248. ZUGRAVEDCU - Recherches biochimiques et histologiques de quelques lésions hépatiques expérimentales avec le CCl_4 - ACAD. REP. POPUL. ROMINE (Inst. med. Interna) 1960, 1, 65-79. (CA 55 3817 c).
-

TABLES DES MATIERES

	page
INTRODUCTION	1
GENERALITES	5
CREATION DE L'ATTEINTE DE L'HEPATOCYTE	23
- Les hépatites nutritionnelles	25
- Les hépatites toxiques expérimentales	35
EVALUATION DE L'ATTEINTE CELLULAIRE	57
- Dosage des lipides hépatiques	59
- Dosage des enzymes sériques	67
- Test à la B.S.P.	87
RESULTATS	99
DISCUSSION ET PROTOCOLE PROPOSE	141
CONCLUSIONS	161
BIBLIOGRAPHIE	163

PROPOSITION DONNEE PAR LA FACULTE

MISE EN EVIDENCE

D'UNE "ACTIVITE DEFATIGANTE"

ETUDE CRITIQUE DES TESTS PROPOSES
